

# **Leistungsparameter und Qualifizierungskonzepte für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie anhand von Bindungskinetiken**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Franziska Pögel  
aus Wolmirstedt

---

1. Referent:	Prof. Dr. Hermann Wätzig
2. Referent:	Prof. Dr. Knut Baumann
eingereicht am:	09.01.2019
mündliche Prüfung (Disputation) am:	03.05.2019

Druckjahr 2019

---

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen:**

Long term kinetic measurements revealing precision and general performance of surface plasmon resonance biosensors

Steinicke, Franziska; Oltmann-Norden, Imke; Wätzig, Hermann

Anal. Biochem. 10.1016/j.ab.2017.05.009

Performance qualification for reproducible Surface Plasmon Resonance analysis

Pögel Neé Steinicke, Franziska; Oltmann-Norden, Imke; Wätzig, Hermann

Anal. Biochem. 10.1016/j.ab.2017.12.027

Data quality in drug discovery: the role of analytical performance in ligand binding assays

Wätzig, Hermann; Oltmann-Norden, Imke; Steinicke, Franziska; Alhazmi, Hassan A.; Nachbar, Markus; El-Hady, Deia Abd; Albishri, Hassan M.; Baumann, Knut; Exner, Thomas; Böckler, Frank M.; El Deeb, Sami

J. Comput. Aid. Mol. Des. 10.1007/s10822-015-9851-6

### **Tagungsbeiträge:**

Performance Qualification in Surface Plasmon Resonance Analysis (Poster)

Steinicke, Franziska; Oltmann-Norden, Imke; Wätzig, Hermann

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft - DPhG, Frankfurt 2014

Long Term Studies for the Development of a Performance Qualification Method on a Biacore X100 (Poster)

Steinicke, Franziska; Oltmann-Norden, Imke; Wätzig, Hermann

42nd Symposium of High Performance Liquid Chromatography, Geneva 2015

Comparison of two binding kinetic assays in long term studies for performance qualification using Biacore X100 (Poster)

Steinicke, Franziska; Oltmann-Norden, Imke; Wätzig, Hermann

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft - DPhG, Düsseldorf 2015

Comparison of Multi Cycle and Single Cycle Kinetic assays in long term studies for performance qualification using Biacore X100 (Poster und Vortrag)

Steinicke, Franziska; Oltmann-Norden, Imke; Wätzig, Hermann

Developments in Protein Interaction Analysis, Berlin 2016

---

## Danksagung

Ich möchte sehr vielen Menschen danken, die mich auf meinem Weg bis hierhin begleitet, ermutigt oder auch durch Kritik angespornt haben.

Zu allererst möchte ich dem Mentor meiner Arbeit, Hermann, ganz herzlich für die Möglichkeit zur Erstellung meiner Arbeit in diesem Rahmen danken. Die Freiheit bei der Gestaltung der Dissertation, sowie der Themenwahl und das nette Arbeitsumfeld sind nicht selbstverständlich.

Dem Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin und dort besonders Dr. Luma Baydoun möchte ich für die Bereitstellung des Biacore X100 Geräts danken.

Ein großer Dank gilt auch meinem Arbeitskreis und der wunderbaren täglichen Kaffee(Tee)runde: Jorrit, Mona, Tobi, Markus, Julia, Matze, Imke, Hans-Otto, Petra, Sandra und all den anderen. Auch meiner erweiterten Tee- und Tratschrunde mit Aga und Hilke möchte ich für unterhaltsame Stunden danken. Aus meinem Arbeitskreis besonders hervorheben möchte ich Imke. Bei Dir möchte ich mich für so vieles bedanken, aber hier nur die wichtigsten Punkte: deine wertvolle fachliche Unterstützung von Beginn an, unsere Gespräche und Diskussionen über SPR und Gott und die Welt und für die viele Zeit, die du zum Korrekturlesen dieser Arbeit aufgebracht hast.

Den Kollegen aus dem fünften Semester, Annika, Miri, Max und Waldemar, möchte ich für die gemeinsamen Stunden im Labor danken, die sich durch Euch nicht immer nach Arbeit angefühlt haben. Außerdem möchte ich Prof. Baumann für die Übernahme des Koreferats dieser Arbeit danken.

Ein kleiner Dank geht auch an meinen ehemaligen Chemie LK-Lehrer, Herrn Kempe. Ich mag Chemie und ich habe etwas daraus gemacht, auch wenn Sie gesagt habe, ich solle lieber etwas Anderes machen, da Chemie nichts für mich wäre.

Bei meinen Mädels, Kathi, Rebecca, Ela, Bina, Janina, Annika, Ines und Anna möchte ich mich für die tolle gemeinsame Zeit und Freundschaft bedanken. Anna, ich danke Dir für die vielen Kommata, die du in dieser Arbeit noch setzten musstest!

Meinen Eltern, Simone und Burkhard, möchte ich danken, dass Sie (fast) immer die Ruhe bewahrt haben, auch wenn ich noch so stur war und Sie, auch wenn meine schulischen Leistungen es nicht immer haben erahnen lassen, für mich nichts für unmöglich gehalten haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei Michael für die unbeirrbar Ruhe und den Beistand in allen Situationen bedanken. Wo und was wäre ich ohne Dich?!

---

„Möchtest du gleich ein Abenteuer erleben oder lieber erst Tee trinken?“ fragte Peter.  
„Zuerst den Tee!“, sagt Wendy schnell.

*James Matthew Barrie, Peter Pan*

---

## Abkürzungsverzeichnis:

SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie
$R_{\max}$	maximale Analytenbindungskapazität
$k_d$	Dissoziationsratenkonstante
$k_a$	Assoziationsratenkonstante
$K_D$	Dissoziationskonstante
SE	Standardfehler
$\chi^2$	Goodness of Fit
$k_t$	Massentransferkonstante
RI	Brechungsindex bzw. Einfluss der der Masse auf den Brechungsindex
USP	United States Pharmacopeia
Ph.Eur.	Europäisches Arzneibuch/Pharmacopoea Europaea
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
GMP	Gute Herstellungspraxis
SOP	Standardarbeitsanweisung
AIQ	Analytical Instrument Qualification
DQ	Designqualifizierung
IQ	Installationsqualifizierung
OQ	Funktionsqualifizierung
PQ	Leistungsqualifizierung
SST	System Suitability Test
QCC	Quality Control Checks
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
GC	Gaschromatographie
NIR	Nahinfrarotspektroskopie
EG	Europäische Gemeinschaft
DIN	Deutsches Institut für Normung
EN	Europäische Normen
ISO	International Organisation for Standardisation
IEC	International Electrotechnical Commission
DAKks	Deutsche Akkreditierungsstelle
FDA	Food and Drug Administration der USA
CL	Mittellinie
UCL	Obere Kontrollgrenze
LCL	Untere Kontrollgrenze
LBA	Ligandenbindungsassay
UV/VIS	Ultraviolettes und sichtbares Licht
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie

---

SAR	Strukturwirkungsbeziehungen
K <sub>A</sub>	Bindungskonstante
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
RIA	Radioimmunoassay
EMIT	Enzyme Multiplied Immunoassay Technique
ECL	Elektrochemolumineszenz
RU	Response Units
IFC	Integrated Microfluidic Cartridge
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex
IgG1	Immunglobulin Subtyp 1
RSD%	Relative Standardabweichung in Prozent
OOS	Out of Specification
AAC	Analytische Affinitätschromatographie
HPAC	Hochleistungsaffinitätschromatographie
FAC	Frontal Affinity Chromatography
PEEK	Polyetheretherketon
HSA	Humanes Serumalbumin
D-Trp	D-Tryptophan
L-Trp	L-Tryptophan

---

## Inhalt

1.	Einleitung und Aufgabenstellung .....	1
2.	Qualitätssicherung für analytische Fragestellungen .....	2
2.1.	Einleitung Qualitätssicherung .....	2
2.2.	Arzneibücher .....	2
2.2.1.	<i>United States Pharmacopeia</i> .....	2
2.2.2.	Europäisches Arzneibuch .....	3
2.3.	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i> .....	4
2.4.	EudraLex Volume 4.....	5
2.5.	Din En ISO/IEC 17025:2017 .....	5
2.6.	Leistungsqualifizierung.....	6
2.7.	Standardarbeitsanweisung.....	6
2.8.	Kontrollkarten.....	7
3.	Ligandenbindungsassays .....	9
3.1.	Ligandenbindungsassays .....	9
3.2.	Dissoziationskonstante $K_D$ .....	9
3.3.	Techniken für Arzneimittel-Protein-Interaktionen .....	10
3.4.	Probleme in der Qualität von Ligandenbindungsassaydaten .....	11
4.	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie .....	13
4.1.	Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz .....	13
4.2.	Grundlagen der Oberflächenplasmonenresonanz .....	14
4.3.	Aufbau der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskope .....	16
4.4.	Sensorchip .....	18
4.5.	Sensorgramm .....	19
4.6.	Biacore X100.....	21
4.7.	Generelle Studientypen für SPR-Spektroskope.....	22
4.8.	<i>Single Cycle Kinetic</i> und <i>Multi Cycle Kinetic</i> im Vergleich .....	22
4.8.1.	<i>Single Cycle Kinetic</i> .....	22
4.8.2.	<i>Multi Cycle Kinetic</i> .....	23
4.9.	Antigen-Antikörpermesssystem .....	24
4.9.1.	$\beta 2$ Microglobulin .....	25
4.9.2.	Humaner Anti- $\beta 2$ Microglobulin Antikörper (Klon B2M-02).....	25



---

4.10.	Wichtige Parameter für SPR-Experimente .....	25
4.11.	Ergebnisse.....	25
4.11.1.	Analytenbindungskapazität .....	25
4.11.2.	Dissoziationsratenkonstante .....	33
4.11.3.	Assoziationsratenkonstante .....	35
4.11.4.	Dissoziationskonstante.....	36
4.11.5.	$\chi^2$ .....	38
4.11.6.	Summe der Beträge der Residuen .....	39
4.11.7.	Massentransferkonstante .....	41
4.11.8.	Brechungsindex .....	41
4.12.	Kontrollkarten.....	42
4.13.	Pipettenkalibrierung und Verdünnungsreihenoptimierung .....	45
4.14.	Erarbeitung einer Standardarbeitsanweisung .....	47
5.	Hochleistungsaffinitätschromatographie.....	48
5.1.	Affinitätschromatographie .....	48
5.1.1.	Einführung .....	48
5.1.2.	Analytische Affinitätschromatographie .....	49
5.2.	Säulenmaterial.....	49
5.3.	Säulenimmobilisierung.....	50
5.4.	Chirale Trennung von D- und L-Tryptophan.....	52
5.5.	FAC mit Carbamazepin zur Bestimmung von Bindungskonstanten.....	56
6.	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	62
6.1.	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie .....	62
6.2.	Hochleistungsaffinitätschromatographie.....	63
6.3.	Zusammenführung .....	64
6.4.	Ausblick.....	65
7.	Methoden und Materialien .....	66
7.1.	Methoden und Materialien für SPR-Experimente .....	66
7.1.1.	Materialien .....	66
7.1.2.	Immobilisierung.....	67
7.1.3.	Puffer .....	68
7.1.4.	Verdünnungsreihen.....	68

---

7.1.5.	Messreihen .....	69
7.1.5.1.	SCK1 .....	69
7.1.5.2.	SCK2 .....	71
7.1.5.3.	MCK1 .....	72
7.1.5.4.	MCK2 .....	74
7.1.5.5.	SCK Xantec 1 .....	75
7.1.5.6.	SCK Xantec 2 .....	75
7.1.6.	Regeneration .....	75
7.1.7.	Sensorchips.....	76
7.1.7.1.	Biacore™ Chips .....	76
7.1.7.2.	Xantec Chips .....	76
7.1.8.	Instandhaltung und Reinigung .....	77
7.1.9.	Eigens entwickelte Standardarbeitsanweisung für die Leistungsqualifizierung...	77
7.1.9.1.	Immobilisierung.....	77
7.1.9.2.	Verdünnungsreihe .....	78
7.1.9.3.	Messläufe .....	78
7.1.9.4.	Evaluierung.....	78
7.1.9.5.	Instandhaltung und Reinigung .....	79
7.2.	Methoden und Materialien für HPAC-Experimente .....	79
7.2.1.	Materialien .....	79
7.2.2.	Immobilisierung.....	80
7.2.2.1.	Erstes Immobilisierungsprotokoll.....	80
7.2.2.2.	Zweites Immobilisierungsprotokoll.....	80
7.2.3.	Chirale Trennung von D- und L-Tryptophan.....	80
7.2.3.1.	Erste Säule .....	80
7.2.3.2.	Zweite Säule .....	82
7.2.4.	FAC Messungen mit Carbamazepin.....	83
8.	Literaturverzeichnis .....	85

## 1. Einleitung und Aufgabenstellung

Ligandenbindungsassays umfassen in der heutigen Zeit ein sehr weit gefächertes Arsenal von unterschiedlichen Methoden und Techniken zur Bestimmung von Affinitäts-, Kinetik- und Thermodynamikdaten. Eine besondere Stellung unter ihnen hat die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie inne, denn mit dieser Methode können sowohl Affinitäts-, Kinetik- als auch Thermodynamikdaten ermittelt werden.

Der Hauptteil dieser Arbeit war die Entwicklung einer Leistungsqualifizierungsmethode für die SPR-Spektroskopie auf dem Biacore X100. Dazu gehörte die Identifikation von Parametern, welche die Systemleistung des Biacore X100 am besten repräsentieren können. Zu diesem Zweck wurde ein typisches Antigen-Antikörper- Bindungsstudiensystem genutzt, das auf dem SPR basierenden Gerät vermessen wurde. Die Parameter, die zur Bewertung der Systemleistung herangezogen wurden, waren die Analytenbindungskapazität ( $R_{\max}$ ), die Dissoziationsratenkonstante ( $k_d$ ), die Assoziationsratenkonstante ( $k_a$ ) und die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), jeweils mit ihren Standard-Fehlern (SE). Weiterhin wurden der  $\chi^2$ , die Summe der Beträge der Residuen der ermittelten Kurve zur gefitteten Kurve, die Massentransferkonstante ( $k_t$ ) und der Einfluss der Masse auf den Brechungsindex in der Probe (RI) untersucht und aufgezeichnet.

Alle diese Parameter wurden in einer Kinetik-Langzeitstudie untersucht, um die stabilsten Rahmenbindungen für zukünftige Leistungsqualifizierungsmethoden aufzuzeigen. Zusätzlich wurde untersucht, welche der genannten Parameter das größte Potential haben, um mögliche Veränderung im System darzustellen, zum Beispiel bedingt durch die Alterung des Chips bzw. des gebundenen Antikörpers. Die Identifizierung des Parameters, der am empfindlichsten auf instrumentelle und bzw. oder externe Einflüsse reagiert, war einer der interessantesten Punkte dieser Arbeit.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit bestand darin, die Analytische Affinitätschromatographie zu etablieren und in ihrer Leistungsfähigkeit zu charakterisieren. Die Übertragbarkeit von voraus gegangenen Arbeiten mit Monolithen für die chirale Trennung und für Bindungsstudien auf industriell hergestellte Silicamonolithe sollte überprüft werden.

## 2. Qualitätssicherung für analytische Fragestellungen

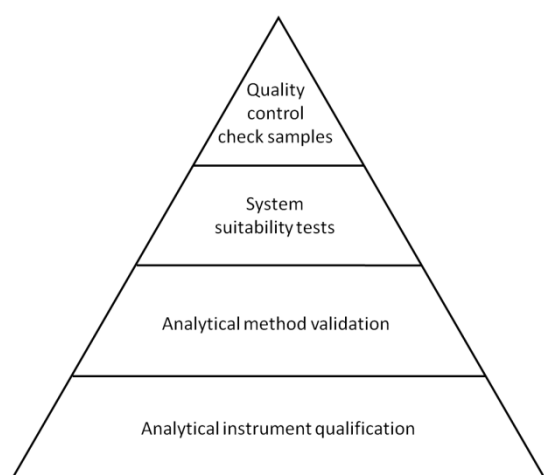
### 2.1. Einleitung Qualitätssicherung

Die Qualität analytisch ermittelter Daten ist sehr wichtig und gewinnt stetig weiter an Bedeutung, weswegen viele Regeln und Richtlinien für die Erlangung dieser sensiblen Daten entstanden sind. Gerade im Bereich pharmazeutischer Entwicklung und Herstellungsüberwachung und vielen angrenzenden Bereichen wie Transport, Haltbarkeit und Eingangskontrollen wird sehr viel Augenmerk auf qualifizierte und validierte analytische Geräte und Methoden gelegt. Als Regularien und Leitlinien haben sich die Arzneibücher, *United States Pharmacopeia* (USP) und das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.), die diese Thematik durchaus unterschiedlich behandeln, die ICH Q2 (R1) Richtlinie der *International Conference on Harmonisation* (ICH) und der europäische GMP-Leitfaden etabliert. Diese Alternativen bzw. verschiedenen Vorschriften werden im folgenden Kapitel kurz vorgestellt und diskutiert. Des Weiteren werden Hilfsmittel zur Überwachung und Aufrechterhaltung der Qualität analytischer Daten wie zum Beispiel Standardarbeitsanweisungen (SOPs) und Kontrollkarten vorgestellt und ihre Bedeutung erläutert.

### 2.2. Arzneibücher

#### 2.2.1. *United States Pharmacopeia*

Im *General Chapter* <1058> [1] wird im Arzneibuch der Vereinigten Staaten von Amerika (USP) ausgiebig auf die Wichtigkeit der analytischen Instrumenten Qualifizierung, kurz AIQ, eingegangen. Hier wird auch die wichtige begriffliche Abgrenzung zwischen Methodvalidierung und Gerätequalifizierung gemacht. Die zeitliche Reihenfolge von Qualifizierung, Validierung, Systemeignungstest und Qualitätskontrollprüfungsproben ist im Datenqualitätsdreieck dargestellt (Abb. 1). Gute und glaubwürdige Daten bzw. Ergebnisse sind demnach nur erreichbar, wenn als erstes eine Gerätequalifizierung gemacht wird.



**Abbildung 1: Datenqualitätsdreieck nach *General Chapter* <1058> USP 40.**

Die vier verschiedenen Phasen der AIQ, nämlich die Designqualifizierung (DQ), die

Installationsqualifizierung (IQ), die Funktionsqualifizierung (OQ) und die Leistungsqualifizierung (PQ), werden definiert und erläutert. Die USP legt darin auch fest, wer für welche der Qualifizierungen zuständig ist. Die DQ ist zum Beispiel Aufgabe des Geräteherstellers und nicht des Anwenders, wobei der Anwender darauf achten muss, dass das Gerät für sein Anwendungsgebiet entwickelt und qualifiziert wurde. Die IQ muss jeweils durchgeführt werden, wenn ein Gerät neu aufgestellt wird oder umplatziert wird. In der OQ muss der Anwender überprüfen, ob das Gerät die angegebenen Funktionen hat und auch die entsprechenden Parameter einhält und ob zum Beispiel eine sichere Sicherungsfunktion gegeben ist. In der PQ, als Leistungsüberprüfung am Ende, wird die Leistungsfähigkeit des Gerätes in Bezug auf den geplanten Einsatz getestet. Es wird auch die Möglichkeit der Überschneidung von OQ und PQ erwähnt. In gegebenen Fällen können diese Prüfungen zusammen durchgeführt werden. Das Konzept der laufenden Leistungsqualifizierung unter anderem mit Hilfe der SSTs und QCCs wird auch genannt. Nicht alle für die Analytik genutzten Geräte müssen gleichbehandelt werden. Die USP teilt hier in drei Gruppen ein, die erste (Gruppe A) sind sehr einfache Geräte wie Magnetrührer, wo eine Funktionsüberprüfung visuell ausreicht. Gruppe B sind Geräte die Werte ermitteln können, zum Beispiel Temperaturmessung, diese müssen Funktionalitätstest unterzogen werden, und IQ und OQ müssen den Herstellerspezifikationen entsprechen. Die dritte Gruppe ist die wichtigste Gruppe. Für Gruppe A und B wurden vereinfachte Qualifizierungsanforderungen aufgrund ihrer funktionellen Einfachheit gegeben. Aber Gruppe C sind die aufwändigeren und automatisierten Geräte, die schon jetzt eine Hauptrolle im Alltag der Labore spielen. Dazu gehören zum Beispiel HPLC- oder GC-Anlagen aber auch die SPR-Spektroskopie-Geräte, um die es später hauptsächlich in dieser Arbeit gehen wird.

Das Kapitel <1058> verweist für die Validierung auf das Kapitel <1225> *Validation of Compendial Procedures*. Dieses Kapitel arbeitet den Begriff Validierung auf und erläutert die wichtigen Parameter die untersucht werden müssen. Diese Parameter sind: Richtigkeit, Präzision (Wiederholbarkeit und Mehrtages-Standardabweichung), Spezifität, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Linearität und Messbereich (*range*). Dieses Kapitel ist stark angelehnt an die Q2 (R1) Richtlinie der ICH (s. Kap. 2.3), weswegen hier jetzt nicht weiter auf diese Parameter eingegangen wird.

Das amerikanische Arzneibuch hat noch mehr Kapitel die sich mit der Validierung beschäftigen. In Bezug auf diese Arbeit sei das Kapitel *Biological Assay Validation* <1033> [2] noch erwähnt. Dieses Kapitel ist explizit für Bioassays geschrieben worden, die sich nicht so einfach validieren lassen, da sie schwer zugängliche Werte/Daten messen.

### 2.2.2. Europäisches Arzneibuch

Im europäischen Arzneibuch ist kein eigenständiges Kapitel zur Validierung analytischer Methoden oder zur Qualifizierung von Geräten enthalten. Im allgemeinen Teil gibt es Passagen, in denen auf Qualifizierung oder Validierung hingewiesen und eingegangen wird [3, 4]. Im Kapitel 5.1.6 des Ph. Eur., in dem es um alternative Methoden zur Bestimmung mikrobiologischer Qualität geht, heißt es: „...muss die Ausstattung, einschließlich der Computer-Hard- und -Software, nach folgenden Gesichtspunkten vollständig qualifiziert

werden“[3]. Im Folgenden wird dann die AIQ mit DQ, IQ, OQ und PQ für Geräte für diese Methode beschrieben.

Im Kapitel der NIR-Spektroskopie wird auf die Überprüfung der Leistungsfähigkeit des Gerätes eingegangen und auch die kontinuierliche Überwachung dieser Leistungsfähigkeit [5]. Die Wichtigkeit der Gerätequalifizierung als Voraussetzung für qualitativ hochwertige Daten findet auch im europäischen Arzneibuch immer mehr Anerkennung.

Eine Besonderheit des europäischen Arzneibuchs ist, dass nur validierte Methoden in den Monographien implementiert sind. Das bedeutet, wer sich an die Methoden hält muss sie nicht mehr selber validieren, außer man wandelt Teile der Methoden ab.

Ansonsten verweisen die Autoren häufig auf die aktuell gültigen Richtlinien für pharmazeutische Analytik, wie zum Beispiel den ICH Richtlinien oder dem EU GMP-Leitfaden.

### **2.3. *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use***

Die Q2 (R1) Richtlinie der ICH [6] beschreibt die Anforderungen für die Validierung von Analysenmethoden und ist eine Vorstellung verschiedener Parameter, die zur Validierung analytischer Methoden im Konsens als am wichtigsten festgelegt wurden. Die ICH richtet sich ausschließlich an die pharmazeutische Chemie. Sie definiert die wichtigsten analytischen Begriffe um Missverständnisse zwischen den drei Hauptparteien, der Europäischen Gemeinschaft, den USA und Japan, ab ihrem Inkrafttreten zu verhindern.

Eine Validierung hat die Aufgabe zu zeigen, dass eine Methode geeignet ist, die geforderten Ergebnisse präzise, richtig und spezifisch zu liefern. Die Richtlinie bezieht sich auf drei Hauptkategorien analytischer Methoden, diese sind: Identifizierungsmethoden, Quantitative und Grenzwert-Tests zur Bestimmung des Gehalts an Verunreinigungen und quantitative Tests des aktiven Wirkstoffes oder anderer Komponenten sowie Assays zum Nachweis der Wirksamkeit. Diese drei Hauptkategorien sind nicht allumfassend, es gibt also auch noch andere Bestimmungen, die hier nicht definiert werden. Die für die Validierung erforderlichen Parameter sind: Richtigkeit, Präzision (Wiederholbarkeit und Mehrtages-Standardabweichung), Spezifität, Nachweisgrenze, Bestimmungsgrenze, Linearität und Messbereich (*range*). Als zusätzlichen Parameter beschreibt die Q2 (R1) die Robustheit einer Methode, also die Unabhängigkeit von kleineren Veränderungen in der Messmethode. Darüber hinaus werden die jeweiligen Parameter im Zusammenhang mit der jeweiligen Bestimmungsmethode beschrieben. Es sind kurze Anleitungen bzw. Beschreibungen wie man diese Parameter ermittelt, damit die Methode den Parameter gut abbilden kann, oder ihre Konformität mit dem jeweiligen beweisen kann.

Als letztes wird die Prüfung auf Systemeignung erwähnt. Sie ist ein wesentlicher Bestandteil der analytischen Methoden um alle Bestandteile des Messsystems in Kombination, also Computer, Gerät und Methode im Betrieb zu validieren. Dafür wird auf die Pharmakopöen verwiesen.

## 2.4. EudraLex Volume 4

Die Europäische Kommission unter der Generaldirektion für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit hat mit dem EudraLex eine Sammlung von Regeln und Vorschriften zur Regulierung von Arzneimitteln in der Europäischen Union herausgebracht. Für die (pharmazeutische) Analytik ist der Band 4 des EudraLex von Interesse, der EU GMP-Leitfaden. Der Leitfaden für die gute Herstellungspraxis enthält den Annex 15, der die Qualifizierung und Validierung erörtert [7]. In der Anlage 15 werden verschiedene Teile zusammengeführt. Es wird hier nicht nur die Gerätequalifizierung behandelt, sondern es werden auch Prozessvalidierung und Dokumentierungs- und Planungsrichtlinien gezeigt, um ein umfassendes und vollständiges Qualifizierungs- und Validierungskonzept zu erhalten. Der GMP-Leitfaden ist selbstverständlich für Arzneimittelhersteller gemacht und deswegen absolut umfassend, was für Universitätsbetriebe oder Forschungseinrichtungen nicht im gleichen Umfang gelten muss. Allerdings kann die Einhaltung dieser grundlegenden Richtlinien die Qualität der erhobenen Daten deutlich verbessern, abgesehen vom *Change Control* Verfahren, Herstellungsprozessvalidierung und Tatsachen, die für die Zulassung von Arzneimitteln wichtig sind, die Qualität der erhobenen Daten deutlich verbessern. Der bedeutendste Part des GMP-Leitfadens ist für diese Arbeit die Beschreibung des Vorgehens der Qualifizierung.

Die Qualifizierung wird nicht nur für Geräte, sondern auch für komplette Systeme, Einrichtung und Hilfsmittel beschrieben. Hauptsächlich werden die im Kapitel <1058> der USP [1] gemachten Qualifizierungsstufen, DQ, IQ, OQ und PQ, auch hier beschrieben. Je nach Komplexität des Gerätes bzw. des Messverfahrens lässt auch der Leitfaden eine Zusammenlegung von IQ, OQ und auch PQ zu. Die Leistungsqualifizierung kann auch in Verbindung mit der Prozessvalidierung erfolgen. Wichtig ist, dass die PQ den kompletten Bereich umfasst, in dem das Gerät genutzt werden soll. Also müssen nicht nur Normalbedingungen, sondern auch Randbedingungen geprüft und überprüft werden.

## 2.5. Din En ISO/IEC 17025:2017

Die ISO Normen werden von der Gesellschaft Internationale Organisation für Normung ausgegeben. Sie sollen eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse wie zum Beispiel in diesem Fall innerhalb verschiedener Laboratorien auf internationalem Stand herstellen und gewährleisten [8]. Laboratorien müssen sich prüfen lassen, ob sie den jeweiligen Standards entsprechen, um eine Zertifizierung zu erlangen. Es existiert keine Pflicht sich zertifizieren zu lassen um am Markt teilzuhaben.

Die ISO-Norm 17025 wurde 2017 aktualisiert und besitzt viele Überschneidungen mit der ISO-Norm 9001. Sie setzt ein Qualitätsmanagementsystem voraus, interne Audits und eine ständige Orientierung an wissenschaftliche Erneuerungen und Weiterentwicklungen aller Methoden und Techniken, die eingesetzt werden. Fachlich kompetente und regelmäßig weitergebildete Fachkräfte, sowie einwandfreies Material, Qualifizierung der Geräte und Validierung der Prozesse und Methoden werden durch die externe Auditierung durch die Deutsche Akkreditierungsstelle (DAKKS) in Deutschland geprüft [9].

## 2.6. Leistungsqualifizierung

Die Leistungsqualifizierung (PQ) ist ein Hauptbestandteil der AIQ und ist schon mehrfach im Kapitel <1058> der USP und des EU GMP-Leitfadens erwähnt worden. Da sich diese Dissertation zu einem großen Teil mit der Leistungsqualifizierung eines Biacore X100 Gerätes befasst, wird hier noch einmal genauer auf das Konzept der PQ eingegangen.

Die Leistungsüberprüfung ist der letzte Schritt nach der Feststellung, ob ein Gerät den vor dem Kauf bestandenen Ansprüchen genügt, ob es an der Stelle, wo es aufgebaut wurde, korrekt arbeiten kann und ob die vom Hersteller gemachten Angaben über zum Beispiel Messgrenzen eingehalten werden. Die PQ ist im Kapitel <1058> der USP folgendermaßen definiert: *“Performance qualification is the documented collection of activities necessary to demonstrate that an instrument consistently performs according to the specifications defined by the user, and is appropriate for the intended use.”* [1]. Bei der PQ wird überprüft in welchen Grenzen und mit welcher Behandlung das Gerät zu einer gleichbleibenden, präzisen und richtigen Ermittlung von Messdaten in der Lage ist. Da Geräte immer von ihrem Bediener und dessen Kompetenz abhängig sind, gibt zum Beispiel der EU GMP-Leitfaden vor, dass nur dafür ausgebildetes Personal mit den jeweiligen Instrumenten überhaupt umgehen darf. Bei der PQ sind insgesamt auch die dafür eingesetzten Hilfsmittel wichtig. Wenn das Zubehör oder die benötigten Prüfproben nicht einen gleichbleibenden Standard bzw. Güteklasse haben, kann das auch einen großen Einfluss auf das Ergebnis und damit auf die Leistung haben. Die Erstqualifizierung eines Instruments ist selbstverständlich, die kontinuierliche Überprüfung der Leistungsfähigkeit nicht immer. Die beiden wichtigsten Richtlinien, also die USP und der EU GMP-Leitfaden zeigen hierfür vereinfachte Wege auf. Damit man ein Instrument für die PQ nicht aus dem laufenden Betrieb nehmen muss, kann man soweit das mit den laufenden Prüfungen vereinbar ist, Systemtauglichkeitstest oder QCCs aus den laufenden Prüfungen benutzen. Mit den SSTs und QCCs können die meisten zu prüfenden Parameter kontrolliert werden, so dass das Gerät für die restlichen Prüfungen nicht für lange Zeit aus dessen Funktion entfernt werden muss. Wie schon angeklingen, können diese SSTs oder QCCs eine fortlaufende PQ nicht komplett ersetzen [10].

Eine PQ sollte nicht nur bei der Erstinstallation oder regelmäßig in der Routine durchgeführt werden, sondern auch nach Reparaturen oder Neuplatzierungen des Gerätes.

Sowohl die USP als auch der EU GMP-Leitfaden machen keine genauen Angaben, welche Tests bei welchem Gerät durchgeführt werden sollen, da das je nach Art und Aufgabe des Gerätes unterschiedlich ist. Es ist die Aufgabe des Anwenders und Bedieners, der sich mit der Funktion des Gerätes auskennt, festzulegen welche Prüfungen auf welche Spezifikationen gemacht werden müssen. Außerdem muss er auch die Spezifikationen festlegen, in denen das Gerät in der Leistungsüberprüfung liegen sollte. Zu diesem Thema gibt es zum Beispiel für chromatographische und elektrophoretische Geräte bereits Arbeiten [11–15].

## 2.7. Standardarbeitsanweisung

Standardarbeitsanweisungen (SOPs) sind in sehr vielen Gebieten der Herstellung und Überprüfung von zum Beispiel Pharmazeutika verbreitet. Die Pharmazeutische Analytik und die allgemeine Analytik können von der Einführung von SOPs profitieren, da die



Standardisierung viele individuelle Fehler minimieren kann.

SOPs sollten schriftlich, systematisch, genau und verständlich in ihrem Aufbau und ihren Aufgaben sein. Im Allgemeinen sollten sie so ausführlich sein, dass jemand der neu an dem jeweiligen Gerät oder mit der jeweiligen Methode ist, die erforderliche Aufgabe gut erfüllen kann. Sie sollten im Idealfall eine kurzgehaltene Anleitung sein, die Schritt für Schritt erklärt, was der Anwender/Bediener machen muss, um einheitliche Ergebnisse zu erzielen [16]. In der Literatur gibt es mittlerweile gute und wichtige Anleitungen wie man SOPs gestalten und verwalten kann [17–23]. Denn eine SOP ist nur sinnvoll, wenn sie verständlich und auch anwendbar ist.

Die FDA hat einen Paragraphen für Richtlinien die Gute Labor Praxis (GLP) für nichtklinische Laboratorien betreffend. In diesem ist ein Absatz der vorgibt, was eine schriftliche SOP enthalten muss, was sie in der Lage sein sollte zu leisten und für welche Prozesse sie vorhanden sein muss [24]. Zum Beispiel sollen diese Standardanweisungen so gehalten sein, dass sie die Qualität und Integrität der erzeugten Daten garantiert.

Die EU erwähnt in ihrem GMP Leitfaden im EudraLex auch die Erfassung von Daten nach einer geprüften schriftlichen Anweisung [25]. Diese Anweisungen sollen klar, eindeutig und befehlsartig formuliert sein [26].

## 2.8. Kontrollkarten

Kontrollkarten sind ein weit verbreitetes Mittel zur Überprüfung von verschiedensten Ergebnissen und Prozessen. Speziell in der pharmazeutischen Industrie können und müssen sie zur Prozessüberwachung und Qualitätskontrolle eingesetzt werden. Sie können statistische Entwicklungen oder Veränderungen von Prozess- und Probenqualitäten offenlegen [27]. Sie können auch ein sehr hilfreiches Instrument zum Vergleich der Gesamtvariabilität mit der gemittelten Variabilität einer kleinen Gruppe von Messwerten sein [28].

Der klassische Aufbau einer Kontrollkarte hat eine *Center Line* (Mittellinie, CL) und eine *Upper* und *Lower Control Line* (eine obere und eine untere Kontrollgrenze, UCL und LCL) [29]. Die Mittellinie stellt in diesem Fall den Mittelwert der ermittelten Messwerte dar, wobei die UCL und LCL die dreifache Standardabweichung um den Mittelwert zeigen. Aus diesem Aufbau können dann die Anzahl der Ausreißer außerhalb der UCL und LCL ermittelt werden. Im Anschluss können diese Kontrolllinien und die Messwerte mit den benötigten Spezifikationen für den jeweiligen Prozess abgeglichen und damit die Prozessfähigkeit untersucht werden [30]. In der Kontroll- oder auch Qualitätsregelkarte können Fehler erster Art aufgedeckt werden und in der Prozessfähigkeitsuntersuchung Fehler zweiter Art abgeschätzt werden.

Es gibt aber auch noch andere Designs von Kontrollkarten. Eine weitere Möglichkeit kann die Darstellung eines Verlaufs von Werten sein, in welchen jeweils eingetragen wird, wann eine Handlung oder Veränderung vorgenommen wurde. Anhand dieser kann man Tendenzen, Ausreißer oder jede Art von Entwicklung mit allen äußeren Einflüssen vergleichen und feststellen, ob diese Entwicklung von der Messmethode oder von der Probenqualität an sich abhängig ist (als Beispiel s. Abb. 25 in Kap. 4.12).

Auch Normalverteilungskurven können eine Kontrollkarte darstellen, wenn man über diese eine Verschiebung weg von einer statistischen Normalverteilung sichtbar machen kann [29].

Die Möglichkeiten der Kontrollkarten als hilfreiches Tool für die Wissenschaft und die Analytik werden häufig noch nicht genug berücksichtigt. Denn sie können schon viel früher als erst in der Herstellungsprozessüberwachung hilfreich eingesetzt werden. Die Kontrollkarten können verdeutlichen, was häufig nicht genügend bewertet wird. Dass zum Beispiel zur Erlangung eines statistisch relevanten Ergebnisses, mehr als einmal gemessen werden muss. Und wenn die daraufhin gewonnenen Ergebnisse noch im Verlauf gezeigt werden, können viele Fehler in der Handhabung oder auch in der Durchführung der Analytik aufdecken werden.

### 3. Ligandenbindungsassays

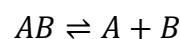
#### 3.1. Ligandenbindungsassays

Ligandenbindungsassays sind mittlerweile ein sehr weites Feld an Methoden und Techniken mit denen man Interaktionen zwischen zwei oder mehr Partnern qualitativ und quantitativ erfassen kann. Das Grundprinzip der LBAs ist, dass eine Gleichgewichtsreaktion (Equilibrium) zwischen den Bindungspartnern stattfindet [32]. Das heißt ein Ligand, der an eine Oberfläche gebunden sein kann, aber sich auch frei in Lösung befinden kann, interagiert mit einem Analyten in der Lösung. Das weitverbreitetste Modell ist der immunbasierte Assay.

Im immunbasierten Assay, ist der der Ligand ein monoklonaler Antikörper, der mit seinem Antigen als Analyten reagiert. Ursprünglich wurden diese Assays über radioaktiv markierte Partner ausgewertet (Radioimmunoassay (RIA)). Eine weitere sehr verbreitete Methode ist der *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA). Hierbei wird die Bindung des Antikörpers an sein Antigen mit Hilfe einer enzymbasierten Farbreaktion sichtbar gemacht. Um Ligandenbindungen nachzuweisen gibt es mittlerweile über den Immunoassay hinaus eine ganze Reihe verschiedenster Techniken, wie zum Beispiel die Affinitätskapillarelektrophorese (ACE), analytische Ultrazentrifugation, isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und zellbasierte Assays. Je nach Technik werden unterschiedlichste Detektionsmethoden genutzt, um die Bindung von Analyt an Ligand sichtbar zu machen, wie UV/VIS- in der ACE, Fluoreszenz- und Chemolumineszenzaktivität im ELISA, Radioaktivität im RIA, oder gänzlich unterschiedliche Eigenschaften des Lichtes wie in der SPR- oder NMR-Spektroskopie [32, 33]. Allen Methoden gemeinsam ist, dass sie die Interaktion von Ligand und Analyt mit sehr hoher Spezifität und häufig äußerst geringen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen messen. LBAs werden gerne und häufig in der Medikamentenforschung eingesetzt [34]. Einige Methoden bieten gute Screening Möglichkeiten, so dass große Bibliotheken von möglichen Liganden mit neu entdeckten oder neu synthetisierten Analyten abgeglichen werden können oder anders herum. Aber LBAs werden auch in der Klinik zum Beispiel für die Diagnostik von Krankheiten eingesetzt oder bei der Polizei für schnelle Drogentests [35, 36].

#### 3.2. Dissoziationskonstante $K_D$

Die Dissoziationskonstante ist ein Spezialfall der Konstante des Massenwirkungsgesetzes. Sie beschreibt, auf welcher Seite der Gleichung, also Assoziation oder Dissoziation, das Gleichgewicht liegt. Sie beschreibt, welchen Zustand das Reaktionspaar bevorzugt, dissoziiert oder undissoziiert. Je höher der Wert der  $K_D$  ist, desto mehr liegt das Reaktionspaar dissoziiert vor und desto schwächer ist die Affinität des Reaktionspaares. Die Ratenkonstanten  $k_d$  und  $k_a$  beschreiben die Geschwindigkeiten der Hin- und Rückreaktion.



**Formel 1: Assoziation und Dissoziation von Ligand (A) und Analyt (B).**

$$K_D[M] = \frac{c(A) \times c(B)}{c(AB)} = \frac{k_d[s^{-1}]}{k_a[M^{-1}s^{-1}]}$$

**Formel 2: Massenwirkungsgesetz in der Spezialvariante Gleichgewichtsreaktion.**  $K_D$  ist die Dissoziationskonstante,  $c$  ist die Konzentration,  $k_d$  die Dissoziationsratenkonstante und  $k_a$  die Assoziationsratenkonstante.

Ein großes Einsatzfeld der LBAs ist die Ermittlung von Dissoziationskonstanten [37, 38]. Das Bindungsverhalten zwischen Arzneimittel und Protein wird normalerweise durch die Messung der  $K_D$  (oder der reziproken Affinitäts- oder Bindungskonstante  $K_A$ ) ermittelt. Die  $K_D$  wird als Gradmesser der Affinität zwischen zwei Partnern genutzt und viele Medikamente werden nach dem Konzept erstens einer hohen Spezifität und zweitens einer hohen Affinität entwickelt. Um ein Optimum an Wirkungsgrad für die Bindungsstärke zu erreichen, wird die  $K_D$  häufig für eine Klasse von Substanzen mit Hilfe von Modellen der medizinischen Chemie untersucht und optimiert [38]. Bindungsstudien sind auch eine Basis für Strukturwirkungsbeziehungen (SAR) und anderen auf Computern basierenden Vorhersagemodellen für das Bindungsverhalten von neuen Substanzen [38].

Die  $K_D$  ist direkt abhängig von den kinetischen Ratenkonstanten, bzw. die  $K_D$  ist der Quotient aus den Ratenkonstanten. Der  $K_D$ -Wert wird durch die jeweiligen Werte der Ratenkonstanten  $k_d$  und  $k_a$  gesteuert. Die Ratenkonstanten können unterschiedliche Werte haben und trotzdem bleibt ihr Verhältnis, also die  $K_D$ , gleich. Deshalb geht man davon aus, dass das korrekte und genaue Messen der Ratenkonstanten eine essentielle Voraussetzung für einen signifikanten und informativen  $K_D$ -Wert ist. Zusätzlich kann die  $K_D$  dafür genutzt werden, ein besseres und tiefergehendes thermodynamisches Verständnis für Bindungspartner zu bekommen, in dem man die freie Energie bzw. die Enthalpie und Entropie des Bindungssystems besser abschätzen kann [39]. Das bedeutet, um die bestmöglichen Ergebnisse für die Arzneimittelentwicklung zu bekommen muss man sich früh Gedanken um die geeignetste Messmethode für den  $K_D$ -Wert machen.

Die Bestimmung von Bindungsaffinitäten ist sehr davon abhängig welche Methode man wählt, denn jede Methode hat ihre eigenen spezifischen Grenzen [40]. Daraus folgt, dass es keinen einzelnen absolut richtigen  $K_D$ -Wert gibt, denn man kann nicht von unterschiedlichen Methoden, in denen die Werte durch unterschiedliche Mechanismen bestimmt werden, erwarten, dass sie identische Werte produzieren [39, 41].

### 3.3. Techniken für Arzneimittel-Protein-Interaktionen

In der Literatur werden über 20 verschiedene Techniken beschrieben, mit Hilfe derer Bindungsstudien für Arzneimittel-Protein Interaktionen durchgeführt werden können. Einige davon sind die Ultrafiltration, die analytische Ultrazentrifugation, kapillarelektrophoretische, spektroskopische und kalorimetrische Methoden [42, 43]. Drei der am meisten genutzten Techniken, um die Bindung zwischen einem Protein und einem Partner zu messen (meistens die Interaktion zwischen zwei Proteinen) sind die isothermale Titrationskalorimetrie, die

Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und Immunoassays, die auf der Detektion von Fluoreszenz basieren [40]. Allerdings gehen die Aussagen zum Teil weit auseinander, wenn es darum geht, welche Assays am meisten eingesetzt werden. Es gibt große Veröffentlichungen, die den Standpunkt vertreten, dass noch immer die klassischen biochemischen oder zellbasierten Immunoassays am meisten genutzt werden, weil die meisten anderen Techniken nicht an die Detektionsgrenzen und Spezifitäten von ELISA, RIA, EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Technique*) und ECL (Elektrochemolumineszenz) Assays heranreichen [34].

Die Detektionsgrenze und Spezifität ist einer der größten Vorteile der klassischen Immunoassays, allerdings bringen sie auch Nachteile, denn schwächere  $K_{DS}$  (im Bereich von  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  M) können mit zum Beispiel ELISA nicht bestimmt werden [44]. Des Weiteren basiert das System erstens darauf, dass der Ligand an der Bodenplatte des Reaktionsgefäßes immobilisiert werden muss und zweitens der gebundene Analyt (fast immer) durch ein zweites Molekül markiert werden muss, welches zum Beispiel ein Antikörper ist, der mit einem Farbstoffmolekül gekoppelt ist, um es durch ein bildgebendes Verfahren (zum Beispiel UV-Licht) sichtbar zu machen. Das bedeutet beide Bindungspartner müssen für die Bestimmung verändert werden, was einen Einfluss auf die Affinität und Reaktionsfähigkeit haben kann. Bei der SPR-Spektroskopie sind Bestimmungen auch im schwächeren Bereich der Dissoziationskonstanten ( $10^{-4}$ - $10^{-6}$  M) durch die Echtzeitverfolgung möglich. Außerdem wird häufig nur eine Bindung (kovalent oder temporär) des Liganden an der Messoberfläche nötig, so dass zumindest der Analyt unverändert bleibt und somit eine Veränderung der Reaktionspartner weniger nötig ist, als bei ELISA. Ein Nachteil kann sein, dass mit SPR-Spektroskopie sehr starke Affinitäten (ab  $10^{-10}$  M) nur noch schlecht bestimmt werden können, wenn die Dissoziation zu langsam ist.

Die klassischen Immunoassays werden in Aufbau und ihren Einsatzmöglichkeiten sehr gut im Buch von Kahn und Findlay besprochen. Dort werden auch wichtige Fragestellung in Bezug auf die Validierbarkeit für die Immunoassays für Arzneimittelentwicklung, pharmakologische und klinische Prüfungen und die Entwicklung von Biomarkern besprochen [34, 45].

Die neueren Methoden und Techniken für LBAs werden in den Veröffentlichungen von Fraser und Shih [46], Yang [43], Vuignier und Schappler [42] sowie Wätzig und Oltmann-Norden [38] ausführlich dargestellt. In den Veröffentlichungen wird auf die Nachweisgrenzen, den Vorteil von unmarkierten (*label-free*) Liganden und Analyten, die Echtzeitmessung und die Validier- und Qualifizierbarkeit eingegangen.

### 3.4. Probleme in der Qualität von Ligandenbindungsassaydaten

Bindungsdatenergebnisse aus verschiedenen, aber auch sogar den gleichen, Ligandenbindungsassays variieren häufig sehr stark, so dass Werte nur als nicht plausibel betrachtet werden, wenn sie sich um mehrere Größenordnungen unterscheiden [38]. Das liegt zum einen an den Problemen, die die biologischen Messsysteme mit sich bringen, zum Beispiel die Variabilität in den Substanzen selber, aber auch daran mit welchen Techniken und Methoden die Daten gewonnen und bearbeitet werden.

Die Autoren Rich und Myszka haben sich viele Jahre sehr intensiv mit der Qualität von SPR-

Bindungsdaten beschäftigt und die veröffentlichte Literatur auf deren Sinnhaftigkeit bzw. Fehler überprüft [47–58]. In diesen Untersuchungen haben sie auf Fehler hingewiesen, die immer wieder begangen werden/wurden und was besser gemacht werden müsste, damit die Daten wahrhafter oder glaubhafter werden. Im letzten Artikel ihrer Serie haben sie eine Checkliste aufgestellt, an derer sich Nutzer von optischen Biosensoren orientieren sollten, um eine vernünftige Basis für die Experimente und Veröffentlichungen zu haben [58]. Diese sogenannte *TBMRFAADOBE*-Checkliste beinhaltet nur die einfachsten Angaben zu Geräten, Analyten und Liganden und Abbildungen von Kurven, was schon ein großes Problem der Gemeinschaft der Nutzer der Biosensoren aufzeigt, dass viele gar nicht die Grundlagen von relevanten Ergebnissen beachten. Wenn man von diesen ganz einfachen Standards zu höheren Zielen, wie zum Beispiel der Präzision, Richtigkeit und Spezifität, die für die Validierung und Qualifizierung gebraucht werden, gelangen möchte, ist das ohne die einfachsten Grundlagen schwierig. Vielen Nutzern von Biosensoren ist die Relevanz von diesen Werten offenbar nicht bewusst, was zu vielen unnützen Daten führt [57] oder im schlimmsten Fall dazu, dass zum Beispiel bei der Entwicklung von Medikamenten mögliche Kandidaten übergangen werden, weil das Ergebnis nach den schlechten Standards nicht passt. Ganz häufig fehlt die schlichte (mehrfache) Wiederholung eines Bindungsexperimentes und ein einfach ermitteltes Ergebnis wird als gegeben hingenommen und interpretiert [58].

Wie schon kurz angesprochen ist auch die Variabilität von den biologischen Substanzen ein großes Problem, was beispielsweise die Vergleichbarkeit von Daten noch stärker vermindert, die von verschiedenen Leuten an verschiedenen Orten mit verschiedenen Proben der gleichen Substanz arbeiten [59]. Dementsprechend ist die Überprüfung von ermittelten Ergebnissen weiter erschwert.

Die Art der Auswertung ist ein weiterer Punkt, der die Validität von (optischen) Biosensordaten stark einschränkt. Häufig wird nur noch auf die Auswertung der Software geachtet und die ermittelten Kurven und klassische Betrachtungen außen vor gelassen [31, 55]. Die Form der Kurven in SPR-Sensorgrammen müssen einem klassischen Aufbau folgen (vgl. Kap. 4.5), sonst zeigen sie nicht interpretierbare und schlicht falsche, durch zum Beispiel Puffereinflüsse verzerrte, Kurven [55]. Auch in der folgenden Verarbeitung von generierten Bindungsdaten werden Fehler gemacht. Dort werden beispielshalber Geraden durch Kurven gelegt, weil der Maßstab der Darstellung so schlecht gewählt ist, dass nicht erkannt wird, dass eine Kurve vorliegt [31].

## 4. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

### 4.1. Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz

Das physikalische Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) wurde zum ersten Mal 1902 [60] entdeckt, und konnte 1968 von Otto [61] und 1971 von Kretschmann [62] näher beschrieben und erklärt werden. In den 1980ern wurden erste analytische Geräte gebaut, die sich dieses Phänomen zu Nutze machten, um die Gasadsorption an der organischen Oberfläche in Gaschromatographiekapillaren zu messen [63]. Seit dieser Zeit fand eine rasante Entwicklung der Technik statt.

Die SPR-Spektroskopie in der Bioanalytik wird genutzt, um Bindungen zwischen zwei Partnern in Echtzeit zu messen. Dabei deckt sie ein breites Feld an Bestimmungen ab, angefangen bei Affinitäts-, Kinetik- und Thermodynamik-Messungen über Spezifitätsmessungen bis hin zu Gehaltsbestimmungen von Proteinen und kleinsten organischen Molekülen [35, 57, 58]. Die SPR-Technologie wird inzwischen in einem weiten Bereich der Forschung eingesetzt, wie der medizinischen Diagnostik, der Bioanalytik, Arzneimittelentwicklung, Materialwissenschaft und der Proteomik [64–66].

Ein großer Vorteil, den die SPR-Spektroskopie gegenüber den klassischen Immunoassays, wie ELISA und RIA, aufweist, ist die Möglichkeit schwächere Bindungsaffinitäten bestimmen zu können. Der Bereich der Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), der mittels SPR-Analytik abgedeckt werden kann, geht von  $10^{-3}$ - $10^{-10}$  M. Außerdem werden keine Reporterenzyme zur Detektion benötigt, wodurch ermittelte Ergebnisse näher an der Realität liegen, da die Analyten nicht in ihrer Konformation verändert werden [38]. Das Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz wird mit den Geräten in Echtzeit aufgezeichnet, folglich werden teilweise sehr schnell verfügbare Ergebnisse generiert. Eine Besonderheit der Messung von Bindungseigenschaften mittels SPR-Technologie ist, dass die kinetischen

Ratenkonstanten einzeln bestimmbar sind. So werden nicht nur die Gleichgewichtskonstanten ermittelt, die sich aus dem Quotient der beiden Ratenkonstanten ergeben.

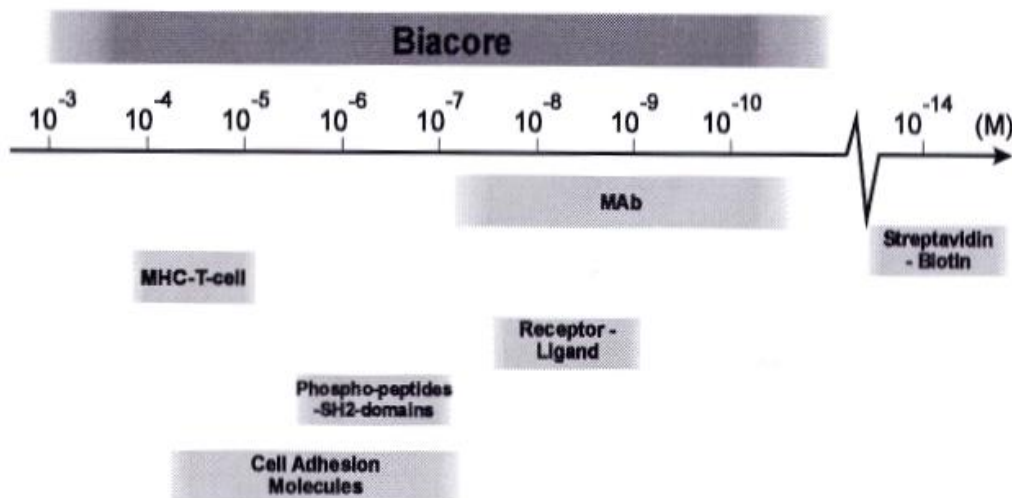


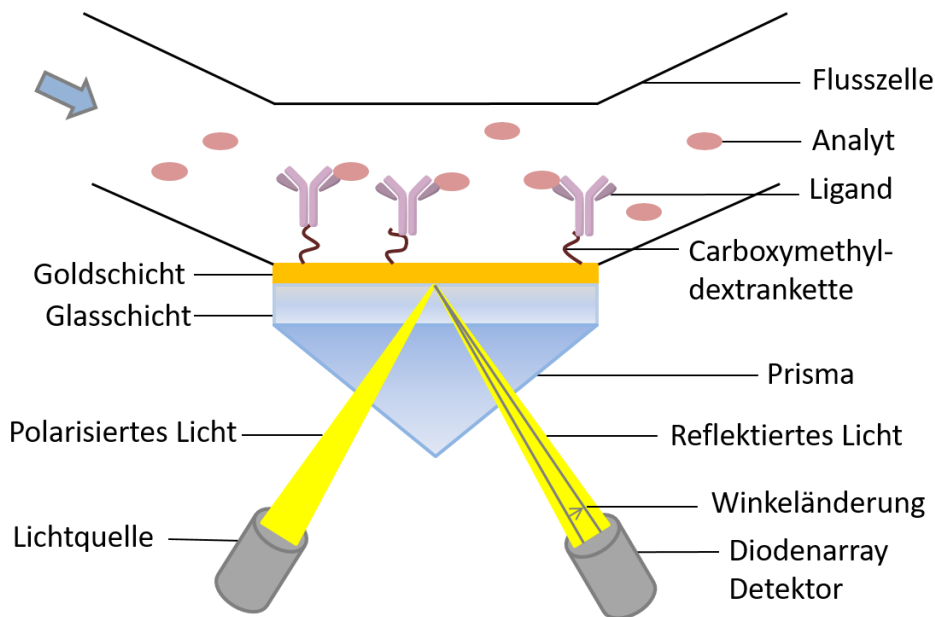
Abbildung 2: Es wird der mit Biacore-Geräten bestimmbare Bereich für Affinitäten illustriert. Exemplarisch ist unter anderem der Bereich für reguläre Antigen-Antikörper (MAb)  $K_D$ s angegeben [67].

#### 4.2. Grundlagen der Oberflächenplasmonenresonanz [65, 68]

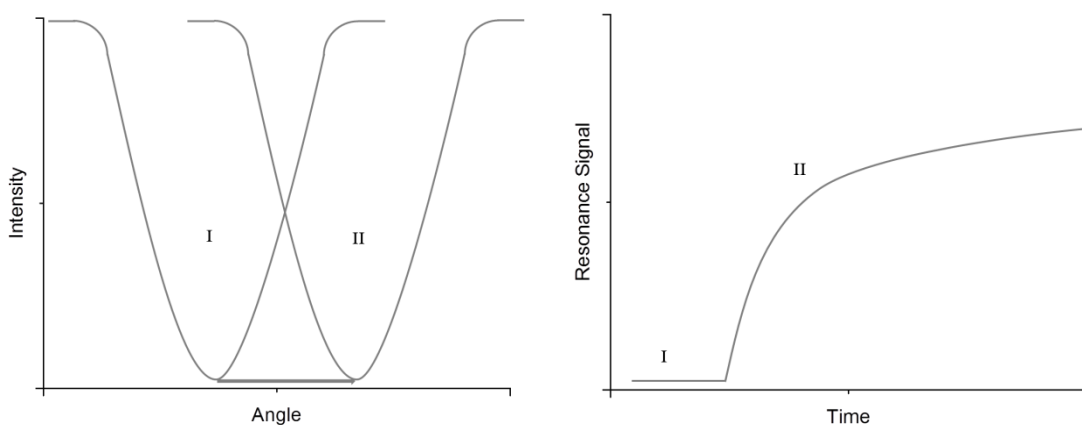
SPR ist ein physikalisches Phänomen von totalreflektiertem polarisiertem Licht. Wenn polarisiertes Licht durch ein Prisma im Totalreflektionswinkel auf einen Metallfilm eingestrahlt wird, wird das Licht reflektiert. Wenn der Einstrahlwinkel kontinuierlich verändert wird, wird ein Minimum im reflektierten Licht sichtbar. In diesem Winkel regt das Licht die Oberflächenplasmonen des Metalls an, was zur Oberflächenplasmonenresonanz führt. Bei dieser Resonanz werden frei bewegliche Elektronen in der Oberfläche des Metalls zu einer wellenartigen Schwingung angeregt. Dieses elektromagnetische Feld, oder auch evaneszente Feld, dringt nur wenige 100 Nanometer in das Medium oberhalb des Metallfilms ein und nimmt exponentiell mit der Entfernung vom Metallfilm ab. Der Winkel, bei dem am wenigsten Licht (Minimum) reflektiert wird, wird Resonanzwinkel oder SPR-Winkel genannt. Dieser Winkel, also auch die Resonanz, ist von den optischen Eigenschaften des Materials abhängig, das den Metallfilm umgibt. Der Brechungsindex, als optische Eigenschaft, bleibt auf der Seite des Prismas immer gleich. Der Brechungsindex auf der der Flusszelle zugewandten Seite ist abhängig von der Masse der gebundenen Teilchen auf dem Metall. Dieser Brechungsindex beeinflusst die Anregungsbedingungen der Plasmonen und hat wiederum einen Einfluss auf den Winkel des Minimums. Auf diese Weise lassen sich die Veränderungen des Brechungsindex auf der Metalloberfläche durch die Änderungen des Winkels des reflektierten Lichtes messen. Je nachdem wie die Oberfläche des Metalls bearbeitet wurde, kann man dementsprechend spezifische Informationen über die Adsorption der Teilchen aus dem Medium ableiten.



Alle Metalle haben die Eigenschaft der Oberflächenresonanz, allerdings ist die Form der Minima sehr unterschiedlich. Silber besitzt das spitzeste, also genaueste Minimum, wohingegen zum Beispiel Aluminium ein sehr breites dementsprechend ungenaues Minimum hat. Das geeignetste Metall wäre folglich Silber, allerdings hat Silber den Nachteil, dass es trotz dessen es ein Edelmetall ist, ein noch immer relativ reaktives Metall ist. Deshalb wird ein Kompromiss gemacht, indem Gold als Oberflächenmaterial benutzt wird. Gold ist ein sehr inertes Metall und besitzt ein relativ schmales und spitzes Minimum im Resonanzwinkel.



**Abbildung 3: Schematische Ansicht der Fluss- und Messeinheit des Biacore X100 (Abb. in Anlehnung an [69]).**



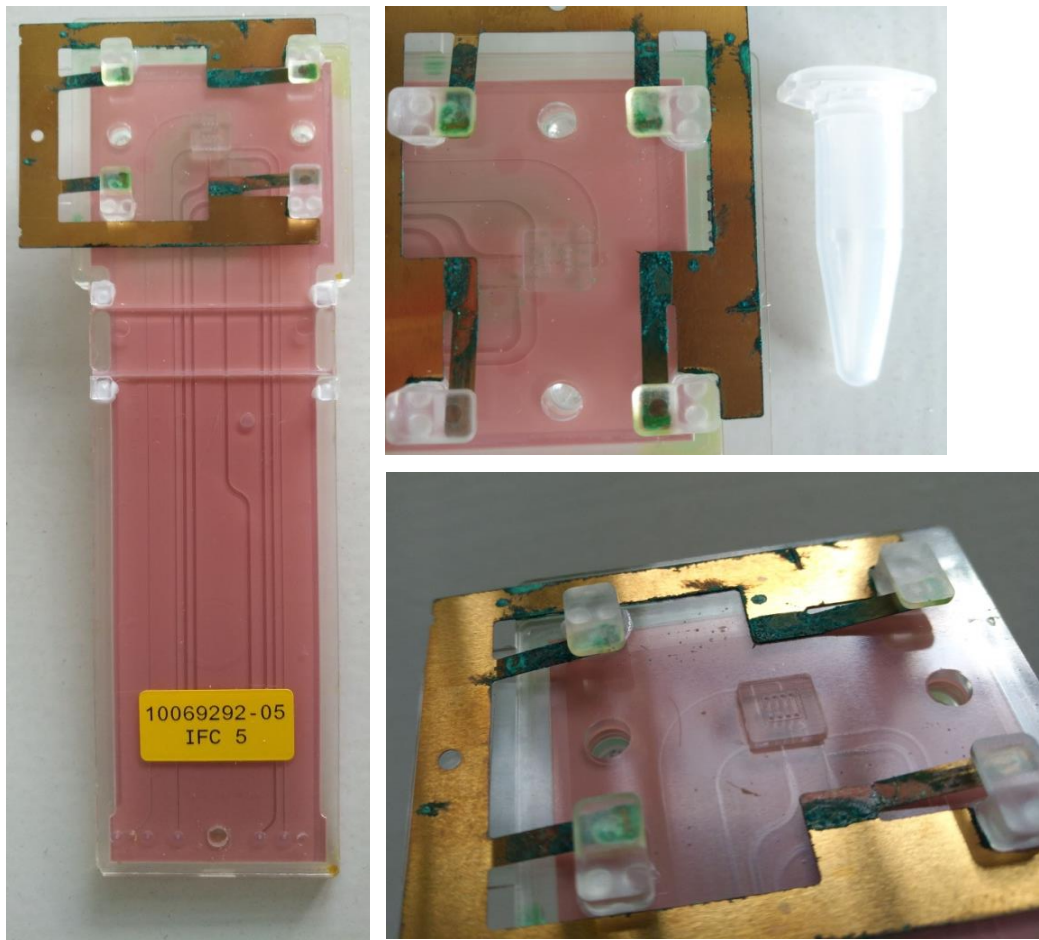
**Abbildung 4: Auf der linken Seite ist die Winkeländerung des Minimums dargestellt. Auf der rechten Seite ist diese Winkeländerung in RU umgerechnet über die Zeit aufgetragen, was zu der bekannten Absorptionskurve führt (Abb. in Anlehnung an [69]).**

Aus der Veränderung des Winkels des Minimums des reflektierten Lichtes kann man, wenn man den Verlauf der Winkeländerung kontinuierlich darstellt und ihm eine Einheit zuweist (*Response Units*, RU), eine Kurve abbilden (Abb. 4). Diese Kurve bildet den zeitlichen Verlauf der Bindung von Masse auf der Oberfläche des Metallfilms ab und nennt sich Sensorgramm. Die *Response Units* geben die Masse pro Fläche wieder, nämlich 1 pg pro mm<sup>2</sup>. 1000 RU entsprechen ungefähr einer Winkeländerung von 0,1°. Das ist nur eine Näherung, da der exakte Zusammenhang vom Brechungsindex abhängig ist.

Der Brechungsindex ist sehr leicht veränderbar. Kleine Variationen an der Oberfläche des Chips, zum Beispiel die Zusammensetzung des Laufpuffers, können große Signalveränderungen hervorrufen. Auch die Fließgeschwindigkeit des Laufpuffers innerhalb der Flusszelle über die Messoberfläche hat einen nicht vernachlässigbaren Einfluss. Da der empfindliche Brechungsindex sich während einer Messung schon allein durch die Zugabe des Analyten ändert, ohne dass dieser an der Oberfläche bindet, werden Referenzmessungen benötigt. (s. Kapitel 4.5)

### **4.3. Aufbau der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskope**

Geräte, die das SPR-Phänomen nutzen, bestehen aus drei grundlegenden Bestandteilen: einer optischen Einheit, einer Flüssigkeitssteuerungseinheit (*liquid handling unit*) und einer Sensoroberfläche.



**Abbildung 5: Die IFC des Biacore X100. In der rechten unteren Abbildung ist das kleine Quadrat der tatsächlichen Flusszelle mit den Flusslinien zu erkennen.**

Bei der optischen Einheit gibt es grundsätzlich drei unterschiedliche Aufbaumöglichkeiten. Die erste Möglichkeit ist ein System mit einem Prisma, die Zweite ein System mit einem optischen Gitter und die Dritte ist ein System, das sich einem optischen Wellenleiter bedient.

Die größte Gruppe bilden die Geräte mit Prismen in der sogenannten „Kretschmann Konfiguration“. Hier wird P-polarisiertes Licht durch das Prisma auf den Goldfilm des Sensorchips projiziert und durch das Prisma zurück auf einen lichtintensitätssensitiven Detektor zum Beispiel eine Kamera gestrahlt. Diese Gruppe spaltet sich weiter in drei Untergruppen auf, in SPR-Geräte mit fächerförmigem Lichtstrahl (*fan-shaped beam*), mit festeingestelltem Winkel (*fixed-angle*) und mit Winkelscanner (*angle scanning*) [69].

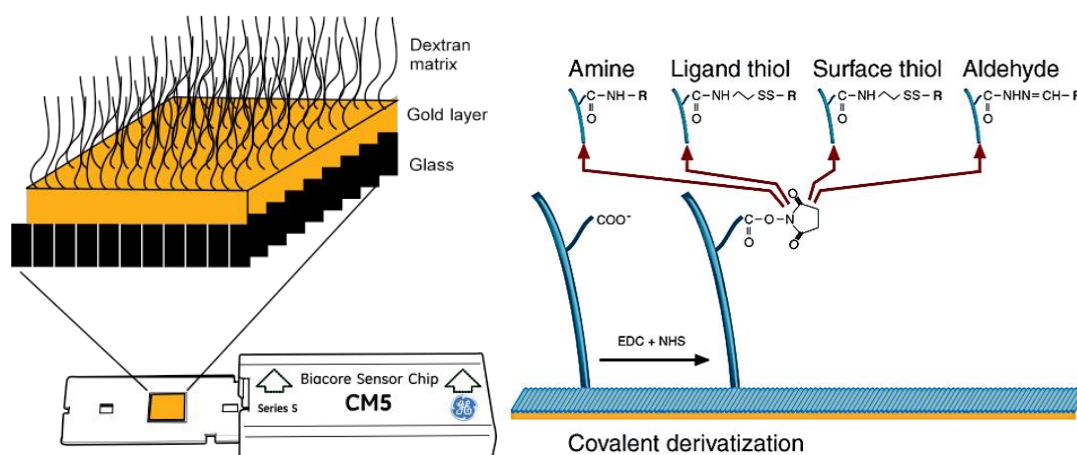
Beim Marktführer Biacore™ werden Geräte mit fächerförmigem Lichtstrahl eingesetzt. Hier wird Licht durch ein dreieckiges Prisma zu einer unendlich schmalen Linie auf den Sensorchip projiziert. Der divergierende Reflektionsstrahl mit dem SPR-Minimum wird mit einem Photodiodendetektor sichtbar gemacht. Das Minimum wird als eine Linie auf dem Detektor von einer Kamera aufgezeichnet. [69]

Die Flüssigkeitssteuerungseinheit muss einen gleichmäßigen und steuerbaren Fluss erzeugen können. In den Biacore-Geräten gibt es, um die Flusszellen zu bilden, eine sogenannte IFC (*Integrated Microfluidic Cartridge*). Dieses Mikroströmungselement wird an die Goldseite des

Sensorchips gepresst und formt die Flusszelle. Das Prisma der optischen Einheit wird von der anderen Seite des Chips angedrückt. Auf diese Weise bildet sich die Messzelle des SPR-Geräts. Die Sensoroberfläche kann sehr unterschiedlich gestaltet werden. Die Voraussetzung hierfür schafft die dünne Goldfolie, die an der Flusszelle zugewandten Chipseite angebracht ist, und die durch chemische Kopplung von Molekülen verändert werden kann.

#### 4.4. Sensorchip

Die Sensorchips sind, wie in Kapitel 4.2 erwähnt, aus einer dünnen Schicht Glas und darauf einer näherungsweise 50 nm dicken Schicht aus Gold aufgebaut. Diese Goldschicht kann an ihrer Oberfläche verändert werden, um bessere Messergebnisse zu erzielen bzw. um überhaupt den Liganden und Analyten im Messbereich der evaneszenten Welle der Oberflächenplasmonen anzureichern, so dass eine Signaländerung gemessen werden kann.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Carboxymethyldextranketten auf der Goldoberfläche des CM5 Chips der Firma GE Healthcare Life Sciences, sowie deren mögliche chemische Derivatisierungen und Kopplungsmöglichkeiten. Außerdem ist in der rechten Hälfte die Aktivierung der Carboxyl-Gruppen mittels EDC und NHS illustriert (vgl. Kapitel 7.1.2) [67].

Die planare Goldoberfläche wird deswegen bei fast allen Chips mit einer Schicht aus Alkanthiolen bedeckt, mit deren reaktiver Thiolendgruppe dann weitere Oberflächenmodifikationen vorgenommen werden können. Die am weitesten verbreitete ist die Kopplung mit Carboxymethyldextranketten (s. Abb. 6). Diese Ketten können unterschiedliche Längen und Carboxylierungsgrade haben, um unterschiedlichste Experimente durchführen zu können. Die Carboxymethyldextranketten haben viele Vorteile für die Durchführung von biochemischen Experimenten. Sie erhöhen die Immobilisierungskapazität der Sensoroberfläche und sie machen den gesamten Raum, der von der evaneszenten Welle durchdrungen wird, für die Experimente nutzbar. Je länger die Dextranketten sind und umso höher die Carboxylierungsdichte, desto mehr Moleküle/Liganden können auf der Chipoberfläche gebunden werden. Zu dieser Gruppe gehören der CM5 und CM7 Chip der Firma Biacore. Mit diesen Chips können von kleinen organischen Molekülen bis hin zu Antikörpern analysiert werden. Wenn allerdings mit sehr großen Molekülen, wie kompletten Viren oder Bakterien gearbeitet wird, müssen die

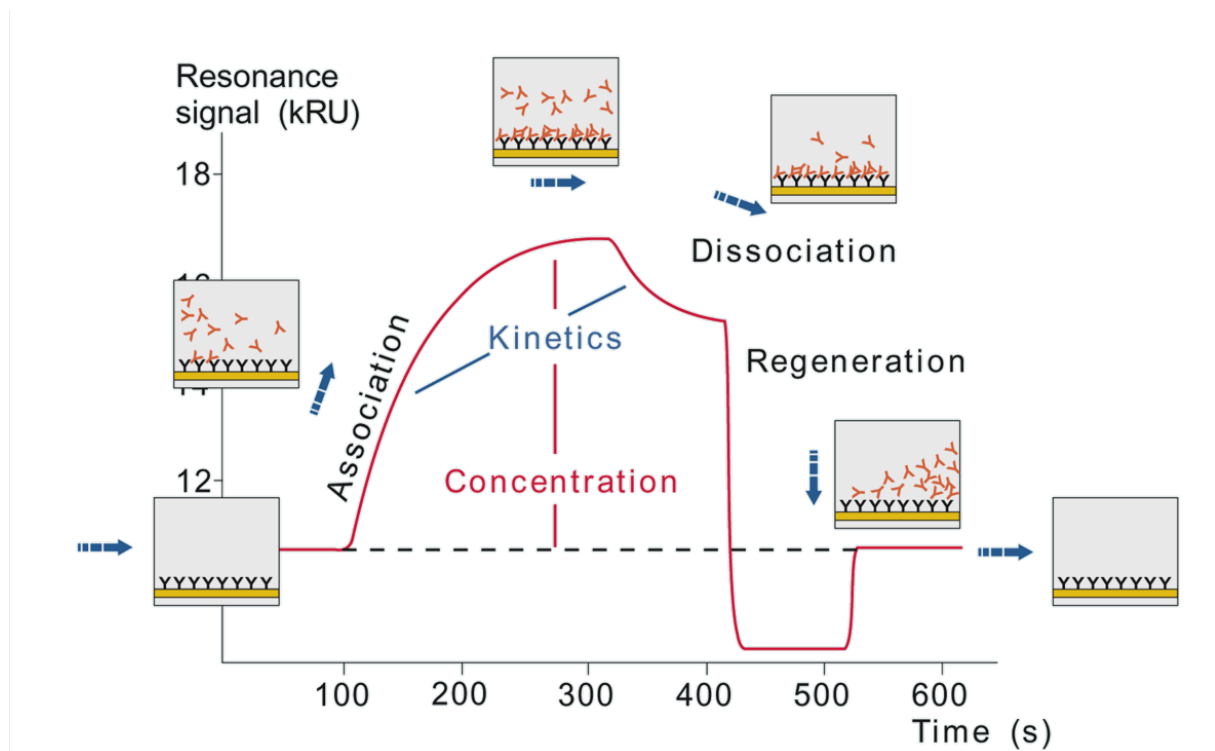
Dextranketten kürzer sein, um die Interaktion von Ligand und Analyt in der Messdistanz der evaneszenten Welle zu halten. Dazu gehört der CM3 Chip. Niedrigere Carboxylierungsgrade sind manchmal von Nöten, um unspezifische Bindungen bei komplexen Gemischen wie Zelllysaten oder Kulturmedien zu minimieren. Dafür wird der CM4 Chip empfohlen. Des Weiteren sind die negativen Ladungen der Carboxylgruppen sehr gut geeignet, um positiv geladene Liganden aus der Lösung elektrostatisch aufzukonzentrieren, um sie dann kovalent zu binden. Außerdem bilden sie eine hydrophile Umgebung für die Experimente.

Die in dieser Arbeit genutzten Sensorchips waren der CM5 Sensorchip von der Firma GE Healthcare Lifesciences und der CMD 500 L von der Firma Xantec. Diese beiden Chips sollen, laut Herstellerangaben, vom Aufbau vergleichbar sein, mit einer ca. 100 nm dicken Schicht Carboxymethyldextranen mit ähnlichem Carboxylierungsgrad [70].

#### **4.5. Sensorgramm**

In einem Sensorgramm kann man in Echtzeit die gemessene Bindungskurve verfolgen. Wie in Abbildung 7 zu sehen, besteht ein klassisches Sensorgramm für eine 1:1 Bindung aus fünf Phasen. Am Anfang, wenn nur Laufpuffer über den Chip läuft, wird der Brechungsindex des Laufpuffers aufgezeichnet und man erhält eine Grundlinie des RU-Signals. Wenn Analyt in die Flusszelle injiziert wird, welcher an einem Liganden an der Chipoberfläche binden kann, steigt das RU-Signal optimaler Weise in einem konvergenten Kurvenverlauf zu einem Maximum an, der Assoziationsphase. Der Kurvenverlauf spiegelt die Anreicherung von Analytmolekülen an der Chipoberfläche wieder. Nach einer festgelegten Zeit wird die Injektion von Analyt gestoppt und nur noch Laufpuffer über den Chip gegeben, diese Phase wird als Dissoziationsphase bezeichnet, da hier die Dissoziation des Analyten vom Chip gemessen wird. Dieser Zeitraum ist wieder frei wählbar. Hier muss die Kurve einen konvexen Verlauf haben. Die Dissoziationskonstante von Antikörper-Antigen-Bindungen liegt mit Werten von  $10^{-7}$  bis  $10^{-10}$  M in einem Bereich von sehr starken Wechselwirkungen, dadurch verläuft die Dissoziation häufig sehr langsam und damit würde in so einem System die Dissoziationsphase nur mit Laufpuffer zu lange dauern. Aus diesem Grund schließt sich in so einem Fall an die Dissoziationsphase mit Laufpuffer eine Regenerationsphase an, in der eine Flüssigkeit für eine kurze Zeit (zwischen 30-90 Sekunden) über die Sensoroberfläche gegeben wird, um den gebundenen Analyten vom Liganden zu lösen bzw. die Oberfläche zu reinigen. Als Regenerationspuffer kommen die unterschiedlichsten Flüssigkeiten zum Einsatz, zum Beispiel

hochmolare Salzlösungen, Puffer mit sehr niedrigen oder sehr hohen pH-Werten oder organische Lösungsmittel wie Ethanol, Methanol oder Ethylenglykol [71, 72].



**Abbildung 7:** Es ist ein klassisches Sensorgramm mit Assoziations-, Dissoziations- und Regenerationsphase dargestellt. Zu jeder Phase gibt es Abbildungen zu dem Geschehen auf der Sensoroberfläche [67].

Die Evaluationssoftware setzt die Messpunkte, wie zum Beispiel den der Grundlinie oder den höchsten Punkt auf der Assoziationskurve nie direkt an die Zeitpunkte der Flüssigkeitswechsel, weil dort häufig Artefakte durch das Schalten der Flusslinien entstehen.

Schlechte Sensorgramme sind zum Beispiel durch fehlende Kurvaturen oder Krümmungen in die falschen Richtungen gekennzeichnet. Sie können zum Beispiel durch zu niedrige Immobilisierungsniveaus oder fehlende Sensitivität des Gerätes entstehen. Außerdem können die Messkurven durch starkes Rauschen beeinträchtigt werden, im Zweifelsfall so stark, dass man die tatsächliche Form der Kurven nicht mehr erkennen kann.

Es gibt drei verschiedene Durchführungsarten der Läufe, die bei den Messungen angewendet werden:

**1. Messläufe:** Dieser Lauf dient dazu, Bindungseigenschaften des Analyten an dem Liganden auf der Sensoroberfläche zu testen. Die Messung beginnt mit der Bestimmung einer Grundlinie. Diese Grundlinie wird mit dem Laufpuffer aufgezeichnet. Danach wird ab einem festgesetzten Punkt die Probe mit dem Analyten in die Flusszelle für einen frei definierbaren Zeitraum injiziert (Assoziationsphase). Ab einem festgelegten Punkt wird wieder nur noch Laufpuffer über den Sensorchip gegeben, auch hier ist der Zeitraum wieder frei definierbar (Dissoziationsphase).

**2. Start up-Läufe:** Diese finden vor jedem Messzyklus statt. Diese Startläufe laufen in gleicher

Weise ab wie die grundsätzliche Messung, der einzige Unterschied ist, dass in der Assoziationsphase kein Analyt injiziert wird, sondern reiner Laufpuffer. Der Laufpuffer wird in dieser Phase genauso lange und mit der gleichen Fließgeschwindigkeit aus einem Probengefäß injiziert wie in der normalen Messung. In der Dissoziationsphase wird der Laufpuffer wieder aus dem Vorratsgefäß über die Sensoroberfläche gegeben. Diese *Start up*-Läufe bereiten die Oberfläche vor, reinigen sie von eventuellen Ablagerungen und „lockern“ die Liganden an der Sensoroberfläche auf. "Auflockern" bedeutet in diesem Fall, dass die Liganden nicht mehr durch noch eventuell anhaftende Analyten oder Bruchstücke von Analyten verklebt oder verbunden werden. Die *Start up*-Läufe werden nicht in die Evaluation einbezogen. Man könnte sie auch als Reinigungs- oder Vorbereitungsläufe bezeichnen.

**3. Blind-Läufe:** Die Blind-Läufe laufen genauso ab wie die *Start up*-Läufe. Allerdings werden sie im Gegensatz zu den *Start up*-Läufen als Referenzläufe in die Auswertung miteinbezogen. Die Messergebnisse dieser Läufe werden von den normalen Läufen mit Analyten abgezogen, so dass Einflüsse im Messsignal, die durch Schaltungen der Flusslinien oder durch Artefakte aufgrund des Flusses an sich, oder durch den Puffer entstehen können, keine Gewichtung mehr haben.

#### 4.6. Biacore X100

Biacore™ ist der Marktführer im Bereich der SPR-Spektroskopiegeräte [69]. Diese Firma war auch die erste, die die SPR-Technologie Anfang der neunziger Jahre zur Marktreife gebracht hat.



**Abbildung 8: Das Biacore X100 mit Sensorchipeingabe und Probenteller [72].**

Das Biacore™ X100 wurde für die Anwendung in einem Umfeld geschaffen, in dem die Nutzer des Gerätes oft wechseln und kleine Probenumfänge gemessen werden, wie zum Beispiel in der Forschung und Entwicklung. Es ist derzeit das kleinste Gerät im Repertoire von GE Healthcare Life Science. Es besitzt zwei Flusszellen auf dem Sensorchip, womit eine mit dem gewünschten Liganden immobilisiert werden, und die andere als Referenzzelle dienen kann. Für einen höheren Durchsatz wurden Geräte wie das Biacore™ 8K, mit acht Flusszellen, entwickelt. In der Arzneimittelentwicklung wird das Biacore™ X100 zum Beispiel für die Entwicklung und Etablierung von Methoden genutzt, um diese dann im Hochdurchsatz auf den größeren und besser automatisierbaren Geräten durchzuführen.

Das X100 kann Dissoziationskonstanten ( $K_D$ ) im Bereich von femtomolaren bis millimolaren



Werten ermitteln. Die Assoziationsratenkonstante ( $k_a$ ) kann von  $10^3$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  gemessen werden und die Dissoziationsratenkonstante ( $k_d$ ) von  $10^{-5}$  bis  $0,1 \text{ s}^{-1}$ . Die Messzelle kann von  $4-40^\circ\text{C}$  temperiert werden. Der Probenhalter kann nicht temperiert werden, die Proben haben dementsprechend Raumtemperatur [72]. Das und dass der Probenhalter nur 16 Proben fassen kann, sind die Gründe, warum das Gerät nicht lange automatisiert arbeiten kann. Zu dem X100 gibt es spezielle Bedien- und Auswertungssoftware, die für den GxP-Bereich geschaffen wurde. Die Bedienungssoftware (*Biacore X100 Control Software*) basiert auf einem Assistenzprinzip (*wizard based*), was bedeutet, dass man durch alle wichtigen Punkte geführt wird und keine geräteschädigenden Sequenzen/Experimente schreiben kann. Der *Wizard* hilft bei der Gestaltung der Messläufe, zum Beispiel bei der Laufzeit und dass wichtige Schritte eingehalten und keine essentiellen Informationen vergessen werden.

Die Auswertungssoftware (*Biacore X100 Evaluation Software 2.0*) öffnet sich automatisch nach einer erfolgten Messung. Die Kurven können mit verschiedenen Fits (zum Beispiel 1:1 oder bivalent) ausgewertet werden und auch mehrere Messungen übereinandergelegt werden. Die Ergebnisse können anschließend in verschiedensten Formen wie zum Beispiel in Tabellen, Säulendiagrammen oder *Report-Point-Plots* dargestellt werden.

#### 4.7. Generelle Studientypen für SPR-Spektroskope

Mit dem Biacore X100 können Kinetik- und Affinitätsstudien durchgeführt werden, aber auch Bindungsstudien und Gehaltsbestimmungen.

Die Kinetik von Bindungspartnern kann über die Messung von  $k_a$  und  $k_d$  erfolgen. Diese Parameter können klassisch durch *Multi Cycle Kinetic*- (MCK-) Messungen bestimmt werden oder durch *Single Cycle Kinetics* (SCKs) (s. Kapitel 4.8). Die Affinität kann im gleichen Messmodus durch den Quotienten der Ratenkonstanten ermittelt werden ( $K_D$ ) oder durch eine Messung des Gleichgewichtszustands.

Bindungsanalysen geben Auskunft über die Bindungsspezifität und -charakteristika und können als Vergleichsmessungen zwischen vielen verschiedenen Analyten gemacht werden als *Comparative Ranking*-Studien. Diese Messungen basieren nicht auf kompletten Assoziations- und Dissoziationsphasen mit Kurvenaufzeichnung, sondern auf *Report Points*. Diese werden von der Software zu festgelegten Zeiten automatisch ermittelt und zeigen die Veränderung zur vorher ermittelten Basislinie in RU. Die Ergebnisse werden häufig als Säulendiagramm zum besseren Vergleich dargestellt.

Die Gehaltsbestimmungen werden klassisch mit Hilfe einer Kalibrierkurve von bekannten Konzentrationen durchgeführt.

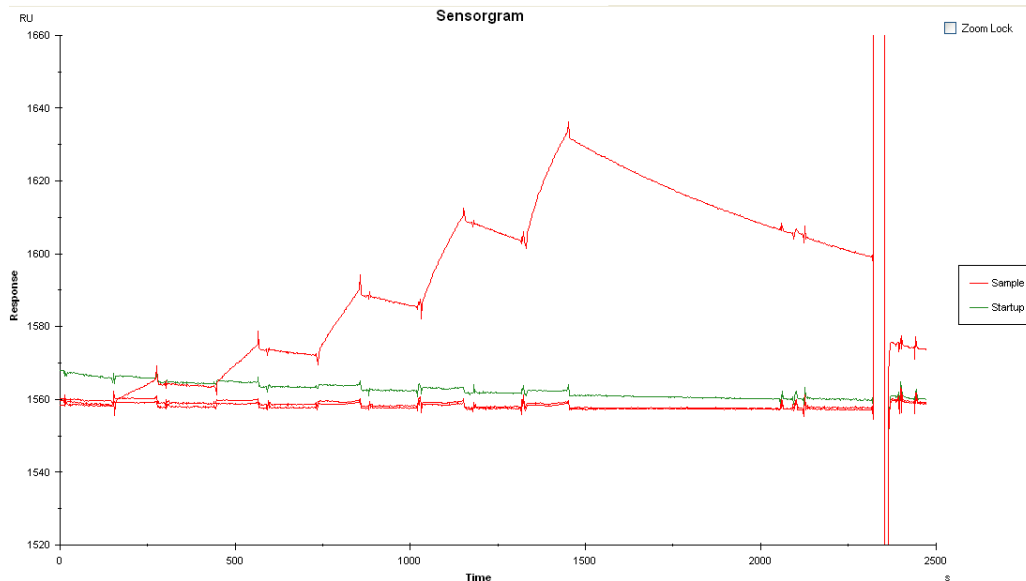
#### 4.8. *Single Cycle Kinetic* und *Multi Cycle Kinetic* im Vergleich

##### 4.8.1. *Single Cycle Kinetic*

Messungen im SCK-Modus bedeuten, dass alle Analytenkonzentrationen gemeinsam in einem in sich geschlossenen Lauf gemessen werden. Die ersten vier Konzentrationen haben jeweils gleichlange Assoziations- und Dissoziationszeiten, die höchste Konzentration hat zur besseren Bestimmung von langsamen Dissoziationskonstanten eine deutlich verlängerte



Dissoziationszeit. Grundsätzlich sind auch mehr oder weniger Konzentrationen in einem SCK-Lauf möglich.



**Abbildung 9: Sensorgramm von Lauf 20140612 2 aus SCK 1.**

Vor dem Analytenlauf findet der *Start up*-Lauf statt (in Abbildung 9 die grüne Kurve) (s. a. Kapitel 4.5). Dieser reinigt die Oberfläche von den noch aus der vorangegangenen Messung anhaftenden Analytenresten.

Die unteren zwei roten Linien in Abbildung 9 sind die Blind-Läufe. Sie werden als Grundrauschen oder Basislinie für die Auswertung von dem Messungslauf abgezogen. Man kann in der Abbildung in diesen Referenzläufen den Einfluss der Schaltungen der Ventile der Flusszelle für die Injektionen bzw. das Stoppen der Injektionen gut sehen. Dieses Rauschen durch das Schalten der Ventile kann durch das Subtrahieren der Referenzläufe vom Analyten-Messlauf bis auf kleine Artefakte fast komplett entfernt werden. Des Weiteren kann dadurch auch das allgemeine Grundlinienrauschen durch Puffer- und Temperatureinflüsse entfernt werden.

Im SCK-Modus sind somit insgesamt vier Läufe nötig um einen Satz an Ratenkonstanten und damit eine Dissoziationskonstante zu erhalten.

#### **4.8.2. Multi Cycle Kinetic**

Messungen im MCK-Modus durchzuführen bedeutet, dass jede zu messende Analytkonzentration jeweils in, in sich abgeschlossenen, Läufen durchgeführt wird. Die Auswertung der Bindungskurve der jeweiligen Konzentrationen erfolgt automatisch mit Hilfe des Biacore Evaluationsprogramms, welches die Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten berechnet. Der MCK-Messmodus beginnt im Normalfall mit zwei *Start up*-Läufen (grüne Kurven in Abb. 10) gefolgt von einem Blindlauf. Darauf folgen die Läufe mit den jeweiligen Konzentrationen des Analyten. Als letztes erfolgt wieder ein Blindlauf für eine weitere zusätzliche Referenz. In der vorliegenden Grafik sieht man ein

Sensorgramm einer MCK-Messung, wie sie im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurde.

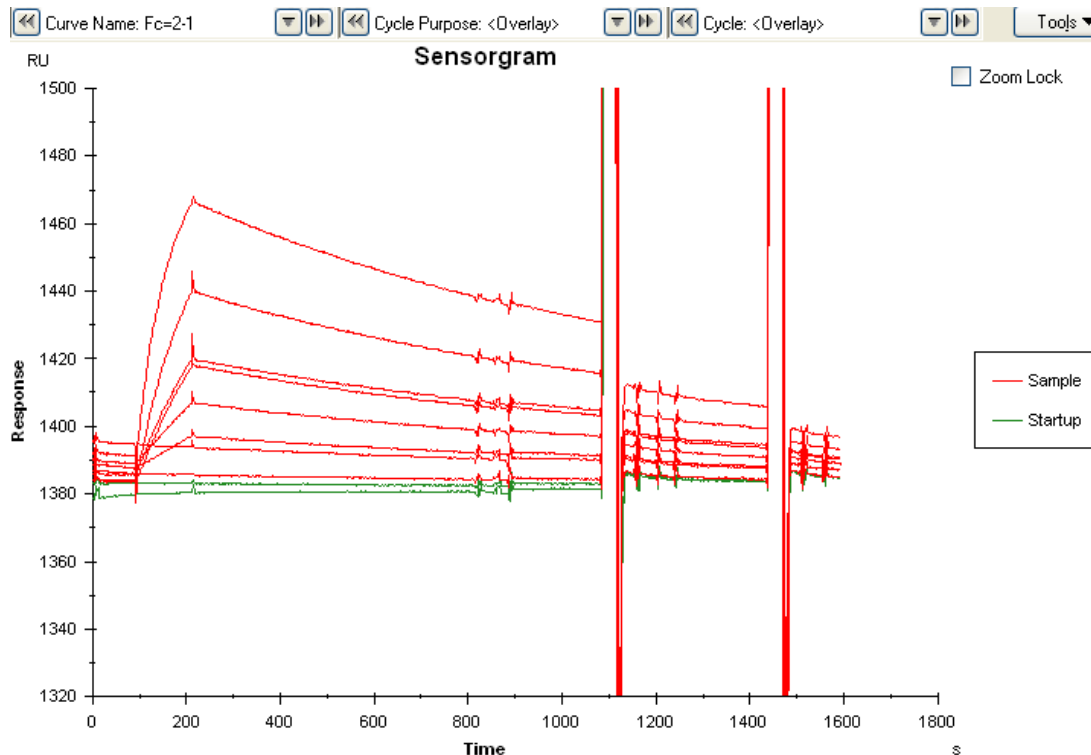


Abbildung 10: Sensorgramm von Lauf 20150220 1 aus MCK1.

Auf die Dissoziationsphase jedes Laufes folgen zwei direkt hintereinander geschaltete Injektionen von Regenerationslösungen. Dieses ist ein weiterer Unterschied zur SCK-Messung, in der am Ende des Messzyklus auf die Dissoziationsphase eine Injektion von Regenerationslösung ausreichte. Diese Verstärkung der Regenerationsbedingungen im MCK-Modus und die Erhöhung um einen weiteren Regenerationsschritt war nötig, um die starke Bindung von Analyt und Ligand möglichst quantitativ zu lösen und somit eine möglichst genaue Rückkehr zur Basislinie zu erhalten. Im MCK-Modus sind neun Messläufe nötig um ein Set Ratenkonstanten und damit eine Bindungskonstante zu ermitteln.

#### 4.9. Antigen-Antikörpermesssystem

Um Systemleistungen am Biacore repräsentativ zu testen, wurde ein häufig benutztes Antigen/Antikörper Messmodell ausgewählt, das humane  $\beta 2$  Microglobulin und der dazu passende humane Antikörper (Klon B2M-02). Dieses System wird auch im *Getting Started Kit* von Biacore™ X100 benutzt. Somit waren schon fertige Strategien für das Puffersystem und die Regenerationshandhabung gegeben. Ein weiterer Vorteil war, dass durch die schon fertig entwickelte und etablierte Methode, alle sonst zu testenden und variierenden Größen des Systems wie die Länge der Assoziations- und Dissoziationszeiten, die Zusammensetzung des

Puffers, der pH-Wert, die Fließgeschwindigkeiten, die Strategie der Regeneration, vorgezeichnet war.

#### **4.9.1. $\beta$ 2 Microglobulin**

Das humane  $\beta$ 2 Microglobulin gehört zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse 1. Es ist die leichte  $\beta$ -Komponente des Antigen-präsentierenden Komplexes. Es besteht aus 99 Aminosäuren und hat ein Gewicht von 11,7 kDa [73].

In der Diagnostik kann man mittels der freien Konzentration von  $\beta$ 2 Microglobulin im Serum verschiedene Krankheitsgeschehen testen. So ist es zum Beispiel ein Biomarker für Lymphome und andere Tumorarten sowie für entzündliche Prozesse oder andere Krankheiten mit erhöhtem Zellumsatz wie AIDS und Leberzirrhose [73].

#### **4.9.2. Humaner Anti- $\beta$ 2 Microglobulin Antikörper (Klon B2M-02)**

Der Anti-  $\beta$ 2 Microglobulin Antikörper wurde wegen seiner Spezifität gegen das humane  $\beta$ 2 Microglobulin ausgewählt. Es ist ein monoklonaler IgG1 Antikörper mit rund 150 kDa [74].

### **4.10. Wichtige Parameter für SPR-Experimente [41]**

Das Ziel der Arbeit war die Identifikation von Parametern, welche die Systemleistung des Biacore X100 am besten repräsentieren können. Dazu wurde ein typisches Antigen-Antikörper- Bindungsstudiensystem genutzt, das auf dem SPR basierenden Gerät vermessen wurde. Die Parameter, die zur Bewertung der Systemleistung herangezogen wurden, waren die Analytenbindungskapazität ( $R_{\max}$ ), die Dissoziationsratenkonstante ( $k_d$ ), die Assoziationsratenkonstante ( $k_a$ ) und die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ), jeweils mit ihren Standard-Fehlern (SE). Weiterhin wurden der  $\chi^2$ , die Summe der Beträge der Residuen der ermittelten Kurve zur gefitteten Kurve, die Massentransferkonstante ( $k_t$ ) und der Einfluss der Masse auf den Brechungsindex in der Probe (RI) untersucht und aufgezeichnet.

Alle diese Parameter wurden in einer Kinetik-Langzeitstudie untersucht, um die stabilsten Rahmenbindungen für zukünftige Leistungsqualifizierungsmethoden aufzuzeigen. Zusätzlich wurde untersucht, welche der genannten Parameter das größte Potential haben, um mögliche Veränderung im System darzustellen, zum Beispiel bedingt durch die Alterung des Chips bzw. des gebundenen Antikörpers. Es ist durchaus interessant zu verstehen, welche Parameter am empfindlichsten auf instrumentelle oder externe Einflüsse reagieren.

### **4.11. Ergebnisse**

#### **4.11.1. Analytenbindungskapazität**

Die Analytenbindungskapazität  $R_{\max}$  des Liganden ist ein globaler Parameter, der direkt von der Evaluationssoftware des Biacore X100 ausgegeben wird. Globaler Parameter bedeutet, dass für diesen Parameter alle Informationen aus den einzelnen Kurven des Experiments zusammen ausgewertet werden. Der  $R_{\max}$  wird in *Response Units* ausgegeben. Er gibt indirekt die maximal mögliche gebundene Masse auf der Oberfläche wieder (1 RU entspricht der Masse von 1 pg pro mm<sup>2</sup>). Der Wert gibt keinen tatsächlich gemessenen Wert wieder, sondern einen extrapolierten Wert, der aus den gemessenen Kurven berechnet wird. Am

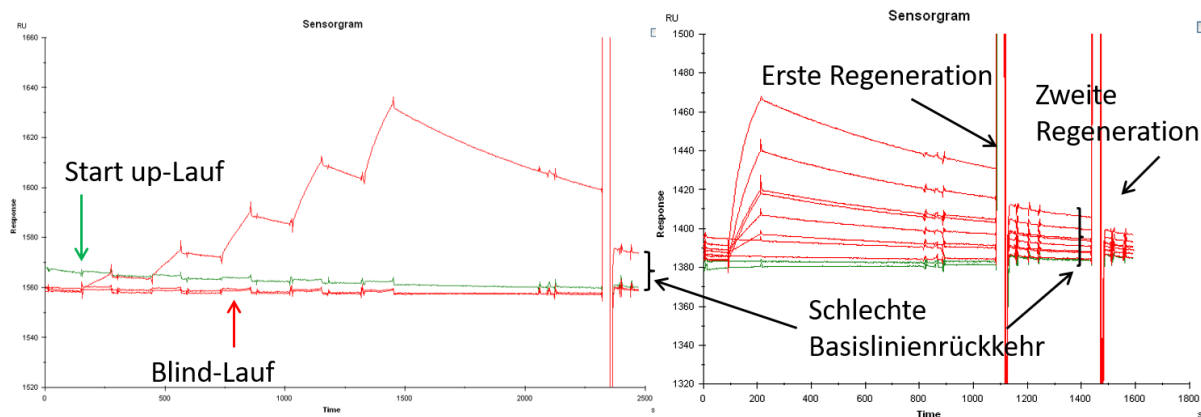
Aussehen der Kurven kann man schon erahnen, ob der  $R_{\max}$  höher oder tiefer liegen wird, da man anhand der tatsächlich gemessenen RU jeder Kurve sieht, ob die Werte höher oder niedriger liegen. In Abbildung 42 (in Kap. 7.1.5.1) ist die Abflachung der Kurven und die Abnahme der *Response Units* über die Dauer der Nutzung gut zu erkennen.

Der Parameter ist gut geeignet, um die Oberflächenbindungskapazität über die gesamte Laufzeit der Chipnutzung zu beobachten und um Informationen über den Zustand und die Lebensdauer der einzelnen Chips und somit die Leistungsfähigkeit der Chip-Oberfläche zu erhalten. Der  $R_{\max}$  kann, dadurch, dass der Ligand kovalent an den Dextranketten auf der Chipoberfläche gebunden ist, die Veränderungen dieser Oberfläche direkt darstellen und anzeigen, wie gut die Effizienz der Analytenbindungskapazität über den Verlauf des Experiments ist.

Während der Arbeit wurde immer deutlicher, wie groß der Einfluss der Regeneration der Chipoberfläche auf die Analytenbindungskapazität ist und wie essentiell für die Messungen im Allgemeinen.

Dieser massive Einfluss wird am deutlichsten, wenn die Langzeit-MCK-Messungen MCK1 und MCK2 verglichen werden (s. Abb. 15). Für jede Messreihe wurde ein neuer Chip benutzt, deswegen sind hier die Effekte einer unzureichenden Regenerationsleistung in den Unterschieden gut zu beobachten. In der MCK1-Messreihe blieben die Werte für  $R_{\max}$  relativ konstant und fielen nur mit der Zeit und der Anzahl der Läufe langsam ab. In der MCK2-Messreihe hingegen streuten die Werte des  $R_{\max}$  deutlich stärker über die gesamte Messreihe, verursacht durch die variierenden (randomisierten) Sequenzen von Analytenkonzentrationen in den Läufen (vgl. Kapitel 7.1.5). Bei Messungen, die mit den höheren Analytenkonzentrationen in ihrem Lauf starteten, waren die Regenerationsschritte nicht ausreichend und der  $R_{\max}$ -Wert stieg, im Gegensatz zu den Läufen, die mit den niedrigeren Konzentrationen starteten (Abb. 15). Das grundlegende Problem ist somit, die nicht ausreichende Regeneration jeweils am Ende der Läufe. Das  $\beta 2$  Microglobulin-Antigen-Antikörper-System besitzt eine hohe Bindungsaffinität mit  $K_D$ -Werten um die  $2 \times 10^{-9}$  M und lässt sich nur sehr schwierig quantitativ trennen. Im Zuge der Entwicklung dieser Messreihe wurde auf Grund dieses Problems ein zweiter Regenerationsschritt für die MCK-Messungen

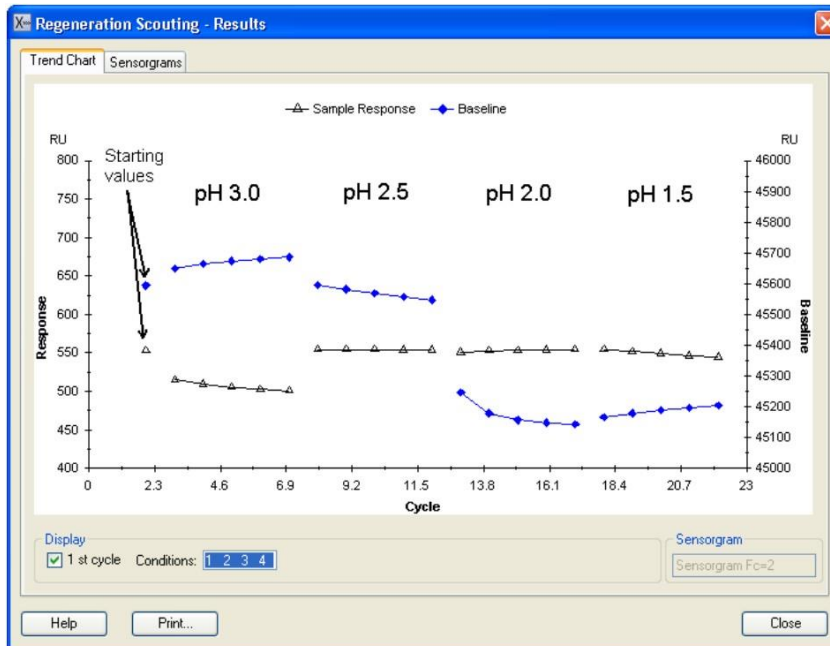
eingeführt. Allerdings führte auch dieser nicht zu einer quantitativen Dissoziation von Antigen und Antikörper (s. Abb. 11).



**Abbildung 11: Vergleich der Basislinienrückkehr zwischen einer SCK-Messung und einer MCK-Messung. Bei der MCK-Messung beeinflusst die schlechte Basislinienrückkehr die Auswertung, weshalb der zweite Regenerationsschritt eingeführt wurde, der das Ergebnis verbessert.**

In die Betrachtung der unzureichenden Regeneration der Chipoberfläche, durch eine 30 Sekunden andauernde Applikation von 10 mM Glycin-HCl Lösung pH 2,5, wurde auch die Möglichkeit weiterer Regenerationsschritte oder anderer (stärkerer) Regenerationsflüssigkeiten einbezogen. Als Regenerationslösungen für die Regeneration von Chipoberflächen, auf denen man Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen misst, eignen sich vorrangig saure Glycin-HCl-Lösungen mit den pH-Werten 1,5 bis 3,0, wie sie auch hier verwendet wurden. Allerdings gibt es für Protein-Interaktionen noch weitere Möglichkeiten, wie zum Beispiel Lösungen mit basischen pH-Werten, organische Flüssigkeiten wie Ethylenglykol (von 50-100 %), hochmolare salzhaltige Lösungen wie Magnesiumchlorid (1-4 M) oder SDS-haltige Lösungen mit einem Gehalt bis zu 0,5 % [71]. Dadurch, dass ein etabliertes Antigen-Antikörper-Messsystem gewählt wurde, entfielen die Regenerationsoptimierungsschritte, in denen die Glycin-HCl-Regenerationslösung mit unterschiedlichsten pH-Werten getestet werden. Diese Tests waren in der Entwicklung des *Getting Started Kits* von GE Healthcare bereits gemacht worden (s. Abb. 12). Diese zeigten, dass eine Glycin-HCl-Lösung mit dem pH-Wert 1,5 zu stark und 3,0 zu schwach waren. Die Lösungen mit den pH-Werten 2,5 und 2,0 waren in etwa äquivalent, weswegen dann die ligandenschonendere ausgewählt wurde [75]. Dementsprechend hätte eine Umstellung auf eine saurere Regenerationslösung keine Vorteile gebracht, sondern nur den Nachteil der kürzeren Lebensdauer des Chips, da der Ligand vermutlich früher, als nach erfolgtem Schema, an Analytenbindungskapazität verloren hätte. Die Basislinienrückkehr ist nun aber eine Voraussetzung für qualitativ hochwertige Messungen. Deswegen, wurde eine weitere 30

Sekunden andauernde Regenerationsinjektion an die erste angehängt, und die daraus resultierende mögliche Lebenszeitverkürzung des Chips/Liganden in Kauf genommen.



**Abbildung 12:** *Regeneration Scouting* für pH 3,0 bis pH 1,5 für das  $\beta 2$  Microglobulin Antigen-Antikörper-Messsystem [75].

Aufgrund der variierenden Reihenfolge, in der die Analytenkonzentrationen in der MCK2 Reihe getestet wurden, starteten die Läufe in diesem Kinetik-Experiment mit unterschiedlichen Voraussetzungen. Wenn die Reihe mit einer hohen Konzentration begann, blieb insgesamt mehr vom Analyten auf der Chipoberfläche haften, als wenn er mit einer niedrigen anfang. Darauf folgende Analytenläufe starteten demnach nicht auf der Basislinie, sondern, auf einem erhöhten Niveau (s. Abb. 11, 13 und 14). Da der  $R_{\max}$  Wert, als Analytenbindungskapazität über alle Konzentrationen in einer Messung im MCK-Modus bestimmt wird, veränderten sich die Werte bei wechselnden Sequenzen in der MCK2-Messreihe deutlich stärker als in der MCK1-Reihe, in der eine fixe Injektionsreihenfolge angewendet wurde. Allerdings bestand auch dort das Problem der nicht quantitativen Regeneration. Hier blieb aber der Fehler über alle Messungen hinweg gleich, weswegen er in der Auswertung keinen so großen Einfluss mehr hatte. Das ist gut zu erkennen, in der

Abbildung 15, wenn man die Gleichmäßigkeit der Abnahme des  $R_{\max}$  von MCK1 mit der mit Schwankungen behafteten Abnahme vom  $R_{\max}$  von MCK2 vergleicht.

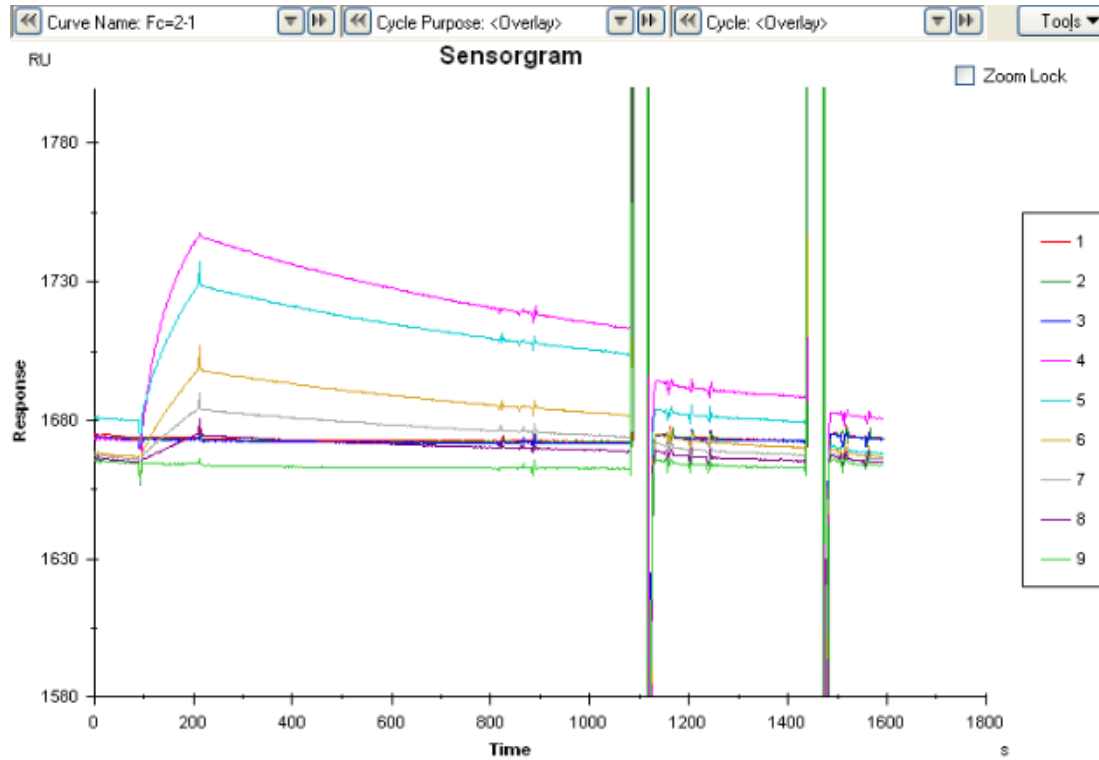


Abbildung 13: Lauf 20150610 2 aus der MCK2-Messreihe mit der Sequenz 1.

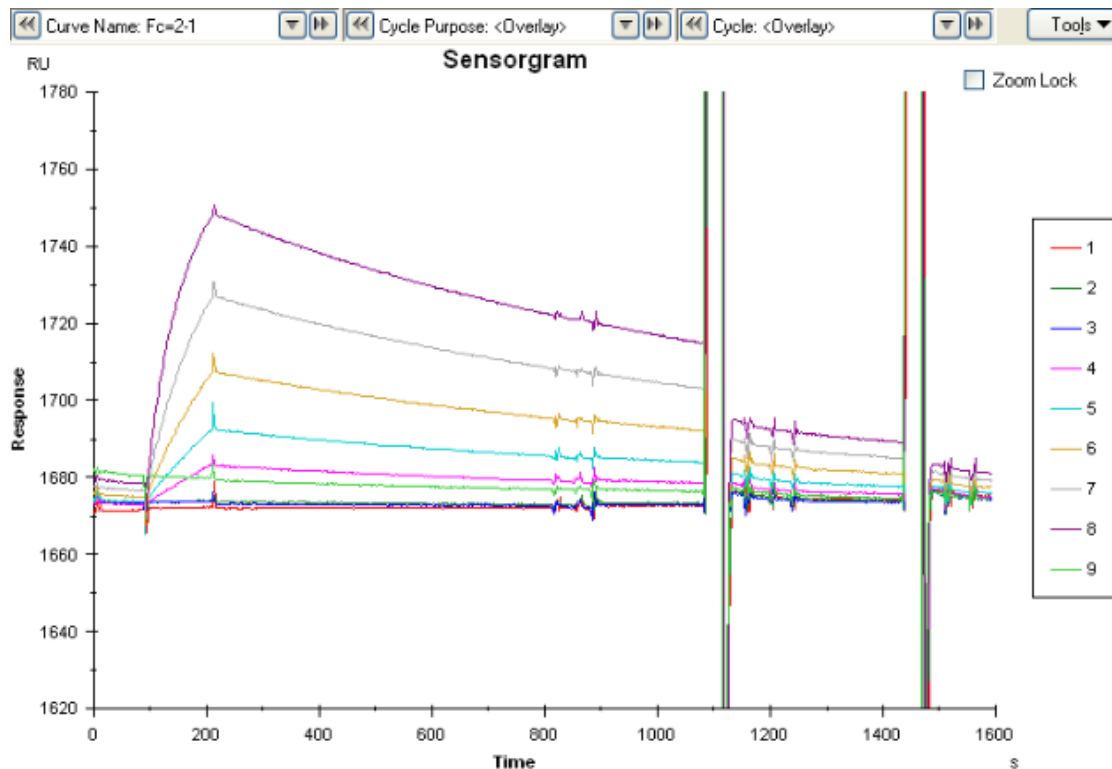


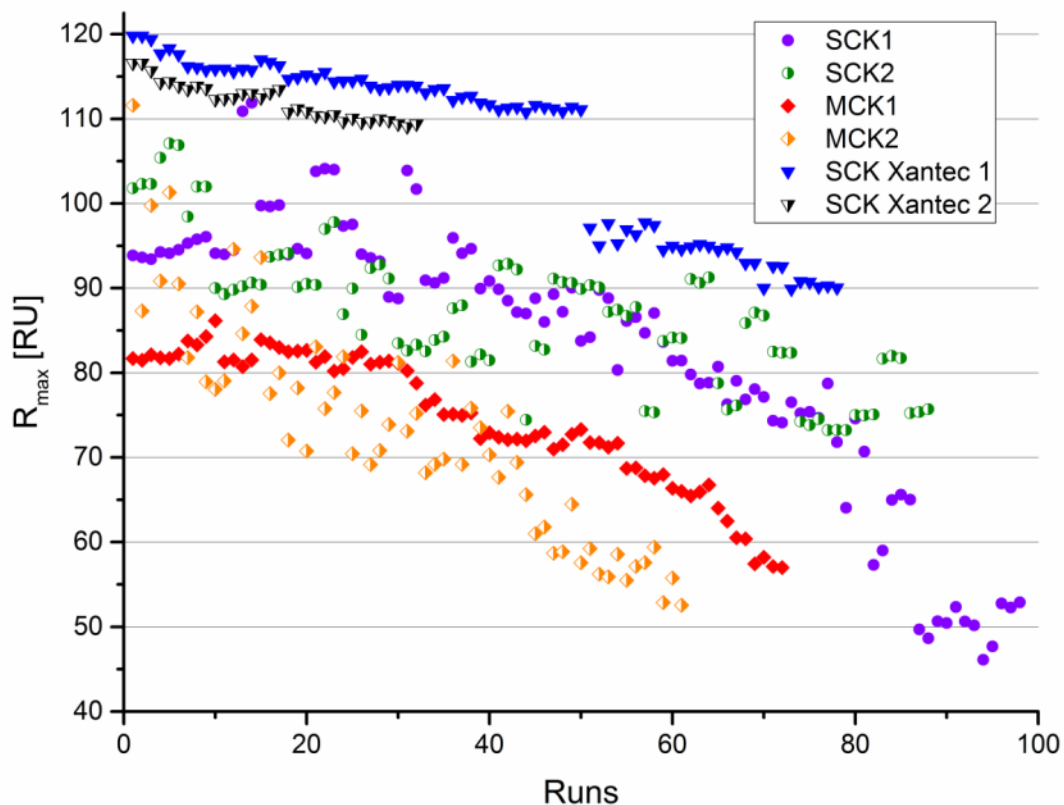
Abbildung 14: Lauf 20150610 1 aus der MCK2-Messreihe mit der Sequenz 2.

Sequenz 1 begann mit einer hohen Konzentration und nahm dann bis zur niedrigsten ab. Sequenz 2 begann mit der niedrigsten Konzentration und stieg dann zur höchsten an. Am letzten Lauf (Nr. 9), der ein Blind-Lauf ist, kann man die Unterschiede bedingt durch das Starten mit unterschiedlichen Konzentrationen gut sehen. In Sequenz 1 liegt der letzte Blind-Lauf deutlich tiefer als die Läufe davor, bedingt durch die stetig sinkende Konzentration an Analyt. In Sequenz 2 liegt der Blind-Lauf deutlich höher als alle anderen Läufe, da der letzte Lauf vor diesem die höchste Konzentration an Analyt enthielt.

In den Messreihen mit Single Cycle Kinetik-Aufbau bestand kein Problem mit der unzureichenden Regeneration, da alle Konzentrationen in einem einzigen auftitrierten Lauf



gemessen wurden. Die Regeneration hatte somit keinen Einfluss auf die Messungen, und bevor die nächste Messung startete wurde ein Reinigungs- (*Start up*-) Lauf durchgeführt.

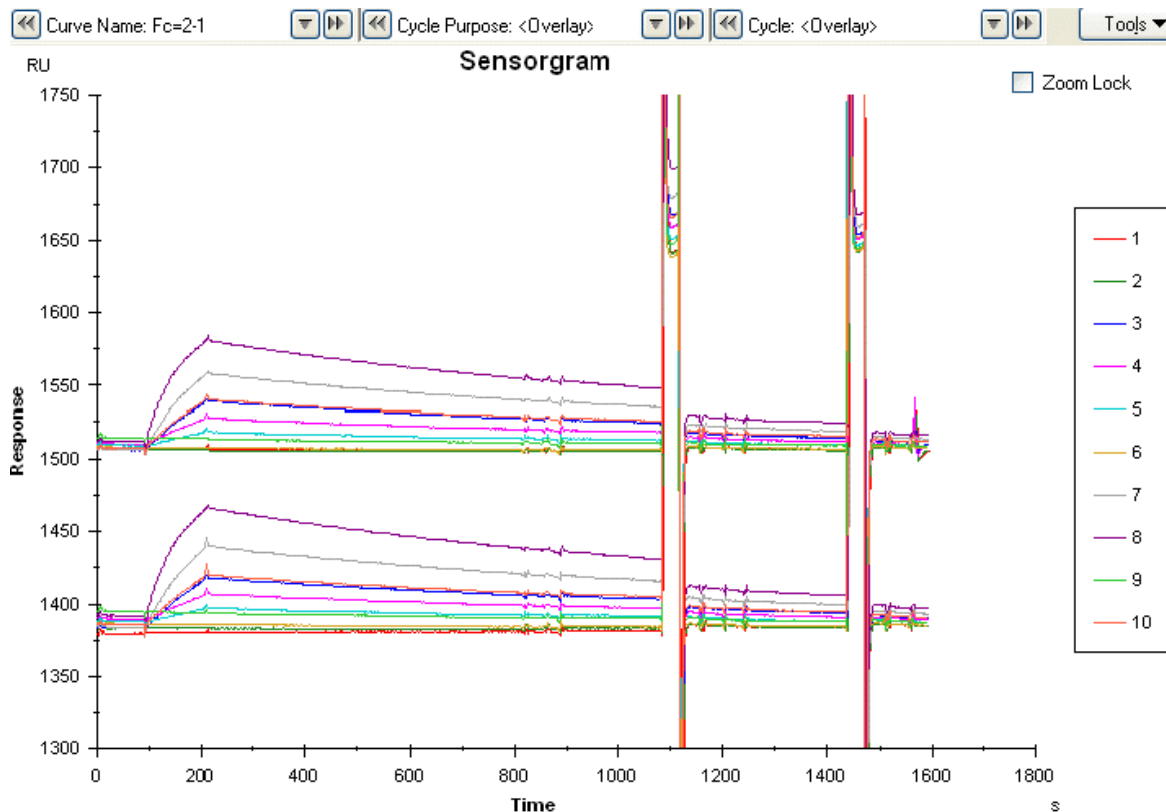


**Abbildung 15: Die Analytenbindungskapazität  $R_{\max}$  über die Anzahl der Läufe für alle Messreihen.**

Bei der Beobachtung der MCK1- und MCK2-Messreihe wurde trotz der variierenden  $R_{\max}$ -Werte deutlich, dass sie im gleichen Rahmen über die gesamte Nutzdauer der Chips abnahmen. Auch in den SCK-Messreihen war eine Abnahme des  $R_{\max}$  über die Dauer der Nutzung des Chips sichtbar (s. Abb. 15).

Diese Abnahme wird durch die Veränderung des an die Chipoberfläche gebundenen Liganden, dem Antikörper, hervorgerufen. Er ist in der gesamten Zeit einem kontinuierlichen Strom an Puffer, Analytenlösungen und Regenerationspuffer ausgesetzt. Mit der Zeit degeneriert und verändert sich der Antikörper und kann den Analyten nicht mehr binden. Außerdem wird der ursprünglich kovalent gebundene Antikörper zum Teil auch wieder abgelöst. Diese Ablösung ist in Abbildung 16 an den unterschiedlichen Höhen der Basislinien der beiden MCK-Messungen auf der y-Achse zu erkennen. Im oberen Lauf liegt die ungefähre Basislinie bei 1525 RU, wobei diese bei der Messung gegen Ende des Chipmesszyklus deutlich niedriger bei etwa 1380 RU liegt. Das Sensorgramm zeigt auf der y-Achse die *Response Units*, die nur durch die Anwesenheit des Liganden und der Carboxymethyldextrankette bis zur Basislinie gebraucht werden und im Verlauf der Messung natürlich die Assoziation und

Dissoziation des Analyten. Im dem Sensorgramm wird nicht der  $R_{\max}$  dargestellt. Der  $R_{\max}$  selber gibt die Analytenbindung an und wird dann erst später berechnet.



**Abbildung 16:** Die Läufe 20150220 1 + 20150325 1 der MCK1-Messreihe in einem Sensorgramm dargestellt, zur Verdeutlichung der Abnahme RUs. Die Obere ist vom Anfang der Messreihe und die untere vom Ende. Trotz der Unterschiede in den RU-Leveln, zeigen beide noch gute und vergleichbare kinetische Werte.  $R_{\max}$ : 82,14 gegenüber 74,96 RU;  $K_D$ :  $8,64 \times 10^{-10}$  gegenüber  $9,32 \times 10^{-10}$  M;  $k_d$ :  $8,09 \times 10^{-4}$  gegenüber  $7,61 \times 10^{-4}$  M;  $k_a$ :  $9,36 \times 10^5$  gegenüber  $8,17 \times 10^5$   $M^{-1}s^{-1}$

Der Antikörper altert vorrangig mit der Zeit, die er genutzt wird. Das konnte durch den Vergleich der SCK- und MCK-Messreihen gezeigt werden (Abb. 15). Bei den MCK-Reihen wurde vierzehnmal häufiger regeneriert, um einen Messwert zu erhalten, als bei den SCK-Reihen. Trotzdem fällt der  $R_{\max}$  bei den MCK-Reihen nicht radikal früher ab. Das bedeutet, dass die Haupteinflüsse auf die Lebenszeit eines Chips, die Gesamtnutzungsdauer, inklusive der Aufbewahrungszeit und der insgesamt gefahrenen Läufe ist (zur Nutzungsdauer s. Kapitel 7.1.5).

Die Xantec CMD 500 L Sensorchips zeigten ein höheres Immobilisierungslevel bei gleicher Immobilisierungsstrategie (s. Kapitel 7.1.2) als die Biacore Chips. Das deutet daraufhin, dass die Chipoberflächen nicht 100-prozentig vergleichbar sind.

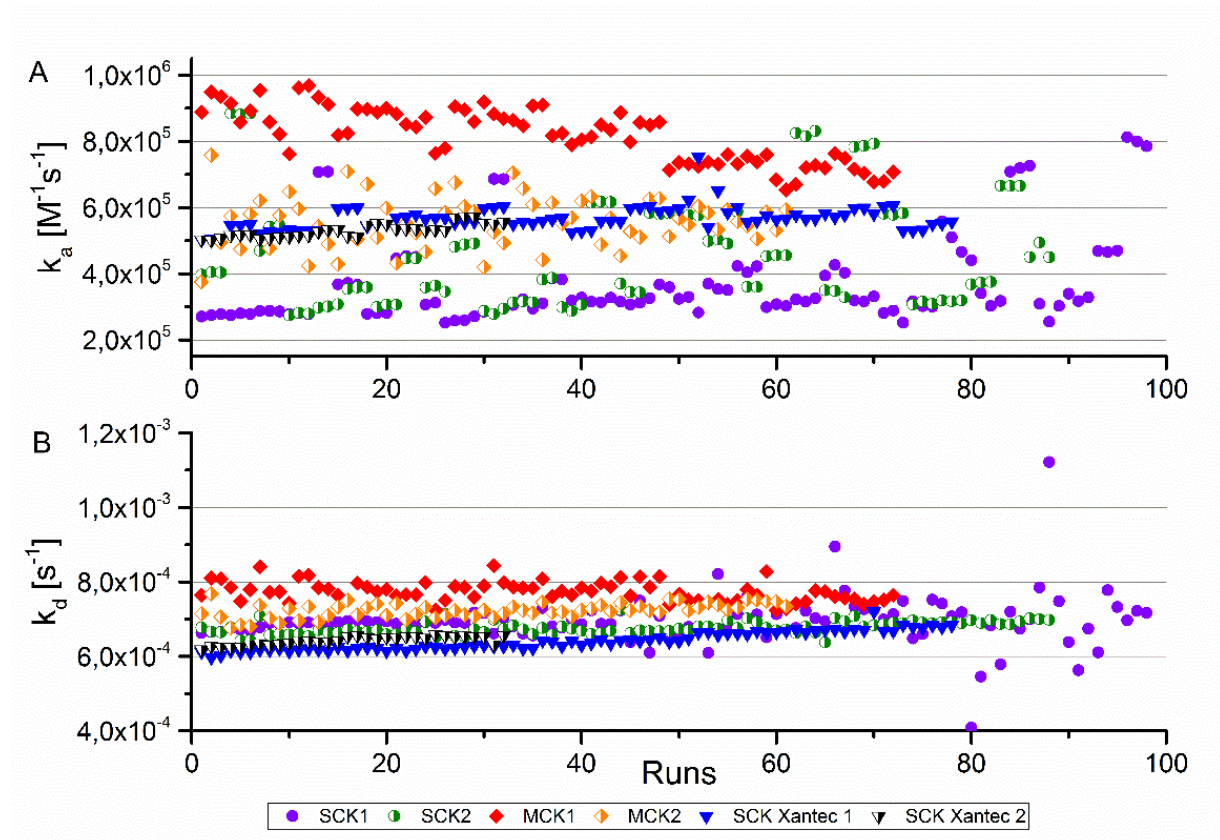
Zur vollständigen Betrachtung des Parameters  $R_{\max}$  wurde in dieser Arbeit am Anfang und am Ende der Nutzung jedes Chips eine Überprüfung der tatsächlichen maximalen Analytenbindungskapazität durchgeführt, da der  $R_{\max}$ -Wert ein theoretisch ermittelter Wert der Software ist. Bei den Messungen, die zusätzlich durchgeführt wurden, um die tatsächliche

maximale Bindungskapazität zu ermitteln, wurden deutlich höhere Konzentrationen des Analyten (256, 128 und 64 nM) über die Oberfläche mit dem Liganden gegeben und im Bindungsmodus der Software vermessen (vgl. Kap. 7.1.5). In diesem Modus wird der Analyt etwa 180 Sekunden appliziert. Der höchste Punkt der Bindungskurve (es sollte eine Sättigung des Liganden eingetreten sein) kurz vor Ende der Applikation des Analyten ist die maximale Bindungskapazität und wird als *Report Point* entnommen. Diese *Report Points* zeigen dann die tatsächlichen maximalen RU-Werte (s. Kap. 7.1.5). Deutlich wurde dabei, dass die tatsächliche Kapazität zwar deutlich über den von der Software ermittelten  $R_{\max}$ -Werten lag, aber die Abnahmen über die Nutzung vergleichbar waren (vgl. Kapitel 7.1.5). Am Anfang der Messreihe lag der  $R_{\max}$  für die SCK1 bei etwa 95 RU wohingegen der experimentell ermittelte Wert bei 128 RU lag. Am Ende der Messreihe sank der  $R_{\max}$  auf ungefähr 50 RU ab und der experimentell ermittelte Wert auf 72 RU. Daraus folgt, dass der theoretisch berechnete  $R_{\max}$ -Wert, auch wenn er nicht den echten Maximalwert angibt, ein Parameter ist, der die reale Abnahme der Bindungskapazität illustriert.

#### **4.11.2. Dissoziationsratenkonstante**

Die Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  war in dieser Untersuchung im Vergleich zu der Assoziationsratenkonstante die stabilere und zuverlässigere kinetische Ratenkonstante. Wenn man die relative Standardabweichung von 2,5 bis 6,2 % (in 30 bis zu 90 Läufen je Chip)

über die ganzen durchgeführten Experimente/Messungen betrachtet, wird die Stabilität offensichtlich.



**Abbildung 17:** Im oberen Bereich ist die Assoziationsratenkonstante und im unteren die Dissoziationsratenkonstante für alle Messreihen über die Zeit dargestellt.

Die  $k_d$  ist dementsprechend größtenteils unabhängig von äußeren Einflüssen. Daraus lässt sich schließen, dass dieser Wert gut für die Messung von Einflüssen innerhalb des Systems bzw. Gerätes benutzt und damit die Systemtauglichkeit (*System Suitability*) getestet werden kann. Dementsprechend ist der  $k_d$ -Wert nicht sinnvoll einzusetzen, um ein besseres Bild über die externen Einwirkungen auf Messungen zu erhalten. In der Abbildung 17 lässt sich in allen Messreihen ein leichter Anstieg über die Zeit beobachten, allerdings ist dieser bei der SCK Xantec 1 am deutlichsten ausgeprägt. Dieser Anstieg ist vermutlich auf die Oberflächenveränderung bzw. den alternden Antikörper zurückzuführen. Die Regeneration und der ständige Fluss über den Antikörper haben, wie im vorangegangenen Kapitel 4.11.1 für  $R_{max}$  bereits angesprochen, eine große Wirkung auf den gebundenen Antikörper. Allerdings haben diese Faktoren einen ganz anderen Einfluss auf die kinetischen Werte als auf die Werte des  $R_{max}$ . Normalerweise würde man eine Abschwächung der kinetischen Konstanten erwarten, also im Falle der  $k_d$  eine Erhöhung der Geschwindigkeit der Reaktion. Das Gegenteil ist, wie in Abb. 17 und Abb. 49 zu sehen, der Fall, denn die  $k_d$  zeigt einen leichten aber konstanten Anstieg über die Zeit, was bedeutet, die Reaktion wird langsamer und damit dissoziiert der Komplex aus Antigen und Antikörper langsamer. Dementsprechend steigt die

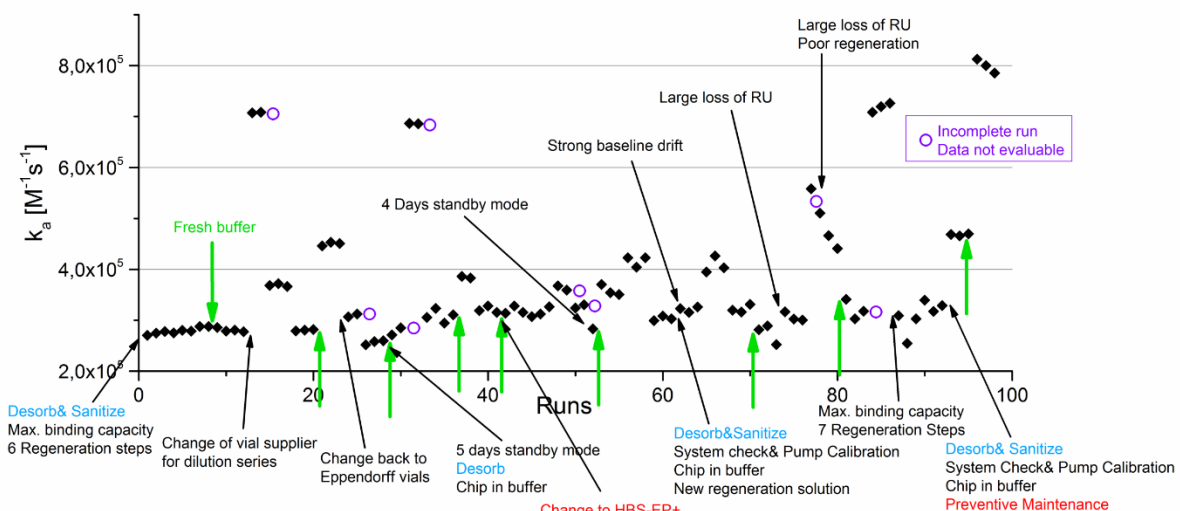
Affinität des Antigen-Antikörper-Komplexes.

Es wird von Herstellern von SPR-Geräten und auch anderen Wissenschaftlern darauf hingewiesen, für Messungen von kinetischen Konstanten, so wenig Ligand wie möglich auf der Oberfläche zu binden [76]. Es soll nur so viel gebunden werden, dass das Signal des Analyten nicht im Basislinienrauschen untergeht. Der Hintergrund für diese Entwicklung in der allgemeinen Praxis ist, dass sich die Auflösung der Geräte verbessert hat und dass die Wahrscheinlichkeit der Kreuzreaktion verringert wird, wenn weniger Liganden an der Oberfläche gebunden werden. Insgesamt geht man davon aus, dass kinetische Werte realistischer werden, wenn weniger Ligand gebunden ist, da die räumliche Beeinflussung herabgesetzt wird. Diese Reduktion des Immobilisierungsspiegels ist ein gängiger Schritt in der Methodenoptimierung [58, 76, 77]. Da in dieser Arbeit allerdings ein bereits etablierter und validierter Methodenassay benutzt wurde, wurde keine Veränderung am Immobilisierungsgrad vorgenommen. Eine Veränderung im späteren Verlauf der Experimente, als die Entwicklung der kinetischen Werte deutlich wurde, hätte die Gesamtvergleichbarkeit deutlich beeinträchtigt. Vermutlich hätte eine Reduktion des Immobilisierungsspiegels den Anstieg der  $k_d$  über die Zeit verhindert, allerdings hätte auch die Lebenszeit des Chips darunter leiden können, da von Anfang an weniger Ligand an der Oberfläche gebunden gewesen wäre.

#### 4.11.3. Assoziationsratenkonstante

Die Assoziationsratenkonstante hat sich als der am besten geeignete Wert herauskristallisiert, um die meisten instrumentellen und äußeren Einflüsse auf das Messsystem sichtbar zu machen. Die  $k_a$  ist ein sehr sensibler Parameter für kleinste Änderungen während der Messungen und in der Probenvorbereitung (Abb. 17).

In den Kontrollkarten von  $k_a$  werden einige Zusammenhänge gut deutlich.



**Abbildung 18:** Es ist die Kontrollkarte für die  $k_a$  aus der SCK1 über die Zeit abgebildet, in der Ereignisse mit den Messungen korreliert werden.

Es sind die 98 Läufe über 69 Messtage der Messreihe SCK1 dargestellt und mit den Instandhaltungs- und Reinigungsaktionen, sowie den Pufferwechseln und anderen Aktionen in Korrelation gezeigt.

Durch die kombinierte Darstellung von Werten und Ereignissen (Abb. 18) wird deutlich, dass sich immer die  $k_a$ -Messwerte dreier aufeinanderfolgender Läufe jeweils sehr ähneln. Diese Dreier-Gruppierung kann durch die Probenvorbereitung erklärt werden.

In der Probenvorbereitung wurde täglich eine Verdünnungsreihe des Antigens in Laufpuffer hergestellt, aus welcher dann drei Aufbereitungen für die jeweiligen drei Messungen pro Tag entstanden. Es handelt sich also bei diesen drei Messpunkten um eine Verdünnungsreihe und dementsprechend um einen Messtag. Anhand dieser Beobachtung zeigt sich, dass  $k_a$  abhängig von der Konzentration des Antigens ist und somit ein guter Indikator für die Gleichförmigkeit der Verdünnungsreihe ist.

Weiterhin waren einige Ausreißergruppen deutlich zu erkennen. Wie in der Kontrollkarte zu sehen, wurden nach Lauf 12 Gefäße von einem anderen Hersteller für die Herstellung der Verdünnungsreihe benutzt, woraufhin die Werte anfangen stark zu streuen. Die Plastikgefäße (*Vials*) können durch Auswaschung von Monomeren oder anderen zugesetzten Vernetzungshilfsmitteln das Verhalten des Antigens beeinflussen. Diese Substanzen können die Proteinfunktion und/oder die Oberflächenspannung zwischen dem Puffer und der Vialoberfläche oder Pipettenspitzenoberfläche verändern und damit auch direkt den Gehalt des Antigens. Unterschiedliche Hersteller der Hilfsmittel, wie in diesem Fall der Probengefäße, können unterschiedliche Substanzen bedeuten, welche dann die kinetischen Assays beeinflussen können [78, 79]. Dieser Sachverhalt macht deutlich, wie sensitiv  $k_a$  ist, da sogar geringste Spuren von chemischen Störsubstanzen die Konstante beeinflussen können und sich über diese darstellen lassen.

RSD %	$k_d$	$k_a$	$K_D$
MCK1	3,47	8,91	7,27
MCK2	2,72	13,99	15,12
SCK1	4,67	30,55	20,35
SCK2	2,35	34,0	28,21
SCK Xantec 1	3,91	6,36	5,91
SCK Xantec 2	1,81	3,96	3,03

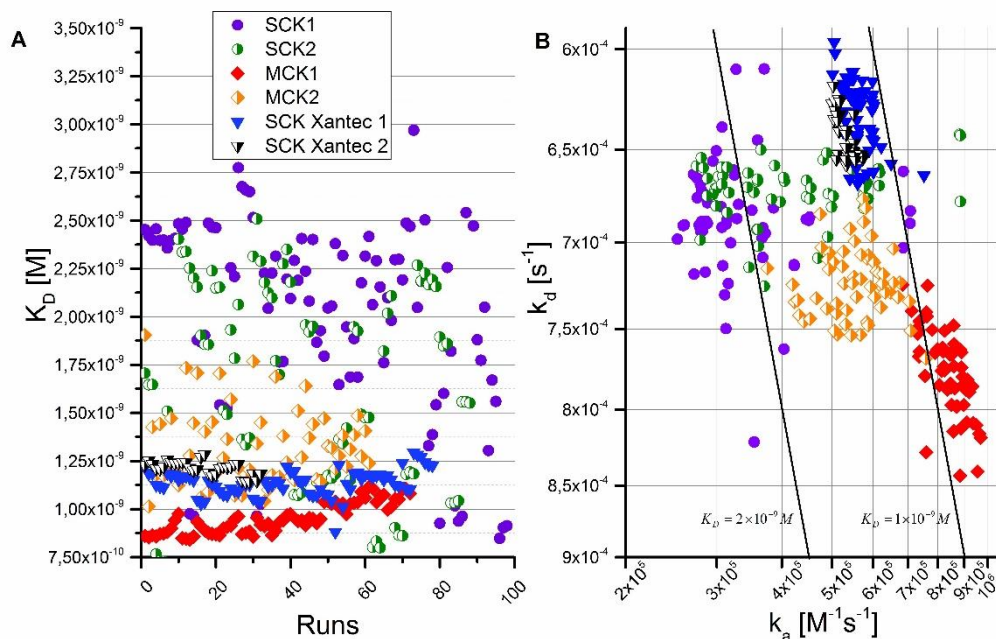
Tabelle 1: Die relative Standardabweichung in Prozent für alle Messreihen für die Parameter  $k_d$ ,  $k_a$  und  $K_D$ .

#### 4.11.4. Dissoziationskonstante

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  wird durch den Quotienten aus  $k_d$  durch  $k_a$  gebildet. Sie zeigt eine vergleichbare Schwankungsbreite wie  $k_a$ , allerdings etwas normalisiert durch die



Einwirkungen des  $k_d$ -Wertes. Der  $K_D$ -Wert wird aufgrund seiner Bedeutung (vgl. Kap. 3.2) für die Vergleichbarkeit von Ergebnissen verschiedener Techniken bestimmt.



**Abbildung 19:** Links ist die Dissoziationskonstante für alle Messreihen über die Anzahl der Läufe aufgetragen um eine Vergleichbarkeit der Werte zu erleichtern.

Rechts ist die Dissoziationsratenkonstante gegen die Assoziationsratenkonstante aufgetragen, als Konsequenz daraus ist die  $K_D$  abgebildet. Es sind die ersten 60 Läufe aller Messreihen (außer für SCK Xantec 2, da diese aus nur 31 Läufe insgesamt besteht) eingetragen. Des Weiteren sind zwei Linien eingetragen, auf denen sich jeweils die  $K_D$ -Werte  $2 \times 10^{-9}$  M und  $1 \times 10^{-10}$  M befinden, um die Betrachtung zu vereinfachen.

Die  $K_D$  (wie auch  $k_a$ ) zeigt sehr starke Schwankungen, welche durch die relative prozentuale Standardabweichung in Tabelle 1 sehr deutlich wird. In den Unterschieden von MCK1 und MCK2 wird der Einfluss des systematischen Fehlers deutlich. MCK1 mit der fixen Injektionsreihenfolge hat mit 7,27 % einen deutlich geringeren RSD % als MCK2 mit 15,12 % mit der variierenden Injektionsreihenfolge. In MCK1 nimmt man den systematischen Fehler für die höhere Präzision in Kauf, wobei MCK2 höchstwahrscheinlich den wahren Wert abbildet, aber mit einer geringeren Präzision. Die SCKs ergaben ein sehr unterschiedliches Muster, die Messungen auf den Xantec Chips ergaben sehr niedrige RSD %s (5,91 und 3,03 %) wohingegen die Messungen auf den Biacore Chips stark schwankende RSD %s erbrachten (20,35 und 28,21 %). Wodurch die Unterschiede zustande gekommen sind, ist reine Spekulation, einige Möglichkeiten wäre aber zum Beispiel der Einfluss der unterschiedlichen Chiphersteller oder die größere praktische Erfahrung bei der Durchführung der Messreihen mit den Xantec Chips.

Für die Überprüfung eines Gerätes macht die Nutzung eines sehr präzisen Messsystems mehr Sinn, als die Nutzung eines Systems, das zwar dem wahren Wert näherkommt, aber dafür starken Schwankungen unterworfen ist. Wenn ein System stärkeren Schwankungen

ausgesetzt ist, ohne dass instrumentelle oder äußere Einflüsse des Operators sie verursachen, können diese Einflüsse sowohl schlechter wahrgenommen als auch ihr Einfluss schlechter ausgewertet werden.

#### 4.11.5. $\chi^2$

$\chi^2$  oder  $\chi^2$  stellt die Güte der Anpassung der Ausgleichsfunktion (*Goodness of Fit*) der Kurve dar. In der Biacore-Software wird dieser Wert genutzt, um die Differenzen zwischen der experimentellen Kurve aus dem Sensorgramm und der dazu gefitteten Kurve darzustellen. Die experimentell ermittelte Kurve wird vom Auswertungsprogramm Biacore Evaluation 2.0 durch einen Marquardt-Levenberg Algorithmus, der die Summe der quadrierten Residuen minimiert, ausgewertet. Dieser Algorithmus stellt den Zähler in der Gleichung von  $\chi^2$ . Er bildet für alle Messpunkte die Summe aus einem gefitteten Wert einer Stelle minus dem experimentellen Wert an der gleichen Stelle zum Quadrat. Um den  $\chi^2$  zu erhalten, wird diese Summe dann durch die Differenz aus der Anzahl aller Messwerte und der Anzahl der gefitteten Parameter, geteilt. Im vorliegenden Fall sind es neun Parameter und mehrere tausend Messpunkte, weswegen sich der  $\chi^2$  zur mittleren Residuenquadratsumme vereinfacht [80].

$$\chi^2 = \frac{\sum_1^n (r_f - r_x)^2}{n - p}$$

**Formel 3: Gleichung für *Goodness of Fit* mit  $r_f$  für den gefitteten Wert zu einem bestimmten Zeitpunkt,  $r_x$  für experimentell ermittelten Wert zum gleichen Zeitpunkt,  $n$  für die Gesamtanzahl der Datenpunkte und  $p$  für die Anzahl der gefitteten Parameter.**

Der Grenzwert, bis zu dem man  $\chi^2$  akzeptieren möchte, muss vor dem Start der Experimente festgelegt werden. Der Grenzwert hängt von dem System ab, das man vermisst. In der Praxis ist im Allgemeinen ein Wert von  $\leq 10$  akzeptabel, da der  $\chi^2$ , wenn das Modell und die experimentellen Daten exakt übereinstimmen, das mittlere Quadrat des Signalrauschens darstellt [80].

In der gesamten Arbeit lag der schlechteste  $\chi^2$  Wert bei 3,07 im Lauf 14 der SCK1 Messreihe. Der Durchschnitt der gesamten Messungen lag bei 0,2-0,8. Dementsprechend lag der  $\chi^2$  Wert weit unter den meistens geforderten Grenzwerten. Die Messreihen der MCK hatten im Durchschnitt niedrigere Werte (MCK1 0,2 und MCK2 0,4) als die SCK Reihen (SCK1 0,5, SCK2 0,8, SCK Xantec 1 und 2 0,6). Der  $\chi^2$  veranschaulicht Veränderungen einzelner Kurven gut in numerischen Werten. Ein deutlicher Anstieg des  $\chi^2$ s ist dementsprechend auch mit einer Veränderung der kinetischen Werte gekoppelt. Dieses zeigen zum Beispiel die Läufe 13, 31, 79 und 84 in den Abbildungen 18 und 20. Beim Vergleich werden die Schwankungen sowohl in den kinetischen Werten als auch dem  $\chi^2$  deutlich, was die Korrelation dieser beiden Werte demonstriert. Aufgrund dessen ist der  $\chi^2$  ein wertvoller Parameter um Änderungen der Messgrößen darzustellen. Allerdings muss in die Auswertung von  $\chi^2$  auch immer die



Form der originalen Kurve mit in Betracht gezogen werden. Falls die Form der Kurve keinen Sinn macht, oder auch der Fit zu dieser Kurve, braucht dieser Wert nicht zu Rate gezogen werden.

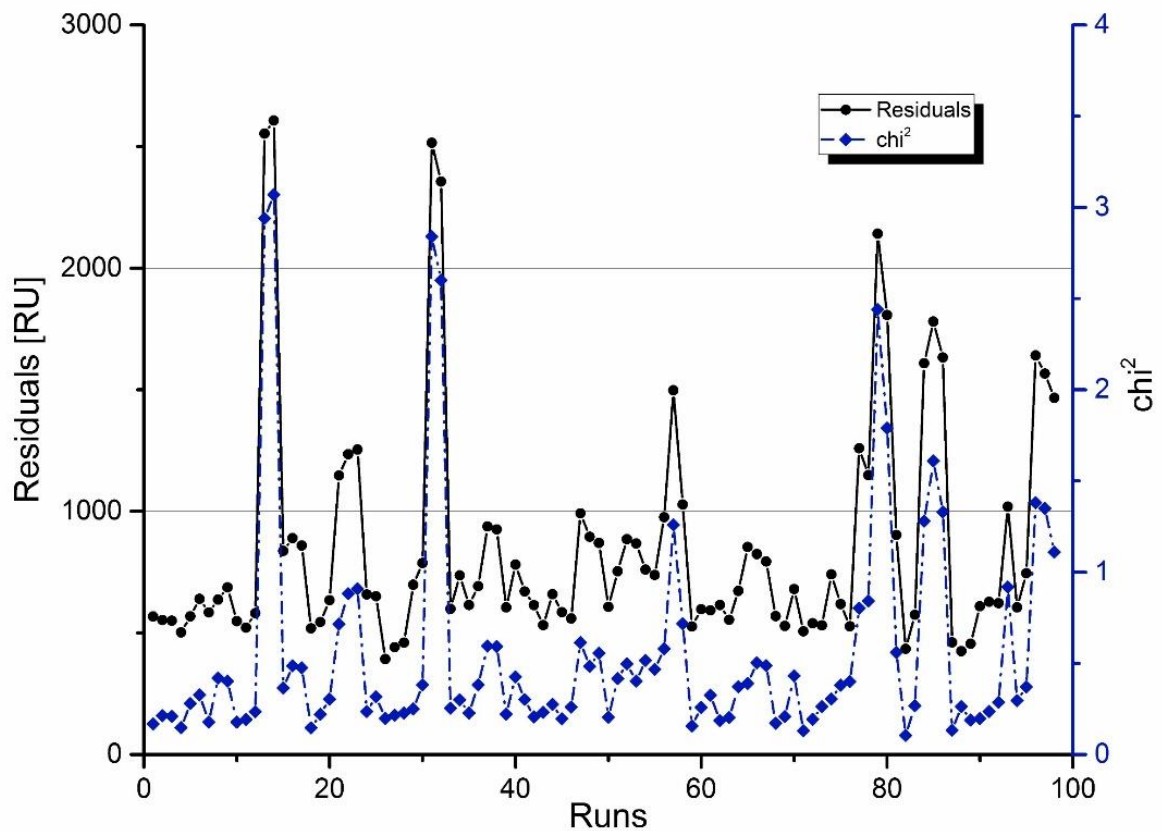
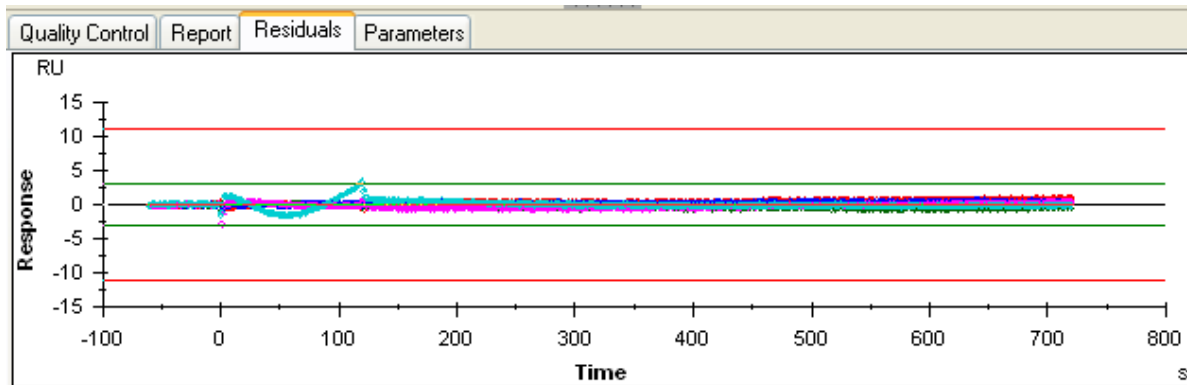


Abbildung 20: Auf der linken x-Achse sind die Residuen und auf der rechten x-Achse der  $\chi^2$  über die Anzahl der Messläufe der Messreihe SCK1 dargestellt um die Korrelation der beiden Parameter zu verdeutlichen.

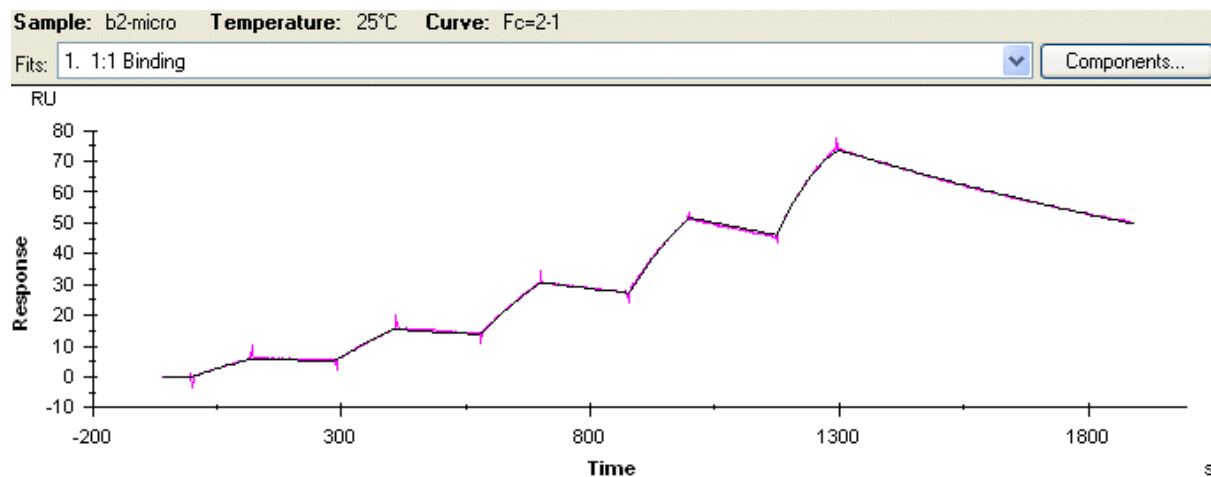
#### 4.11.6. Summe der Beträge der Residuen

Die Residuen entsprechen dem Abstand an *Response Units* zwischen der gemessenen und der theoretischen berechneten Sensorgrammkurve (s. Abb. 21). Diese werden von der Biacore Evaluations Software berechnet. Für die vorliegende Auswertung wurde die Summe der Beträge der Residuen für jede einzelne Messung einer Konzentration in dieser Langzeitmessreihe berechnet und jeweils auch graphisch dargestellt (s. z.B. Abb. 20). Aus diesen einzelnen Summen wurde eine Gesamtsumme der Beträge der Residuen für die

jeweilige Messung berechnet. Es wurde für jeden Chip und dessen jeweilige Messläufe eine grafische Darstellung in der Auswertung in Excel der Residuen erstellt.



**Abbildung 21:** Darstellung der Residuen über die Zeit der Messung 20150220 1 aus der Messreihe MCK1.



**Abbildung 22:** Darstellung eines gefitteten Sensorgramms mit der gemessenen Kurve in pink und der Anpassungskurve in schwarz der Messung 20140606 2 aus der Messreihe SCK2.

Der Parameter zeigte deutlich, welche Konzentrationen die größte Abweichung, über alle Messungen oder in jeder einzelnen Messung, über die ganze Zeit aufwiesen. In dieser Arbeit erwiesen sich sowohl für die MCK- als auch für die SCK-Messungen die Konzentrationen 8 und 32 nM als die mit den geringsten Abweichungen. Das ist bemerkenswert, da in den Berechnungen der Residuen der SCK-Messungen der 32 nM-Konzentration auch die Residuen der 600 Sekunden Dissoziationszeit mit eingehen (s. Abb. 22). Auch in der Messreihe MCK2 mit der randomisierten Injektionsfolge zeigten diese beiden die niedrigste Abweichung. Allerdings muss hierbei auch die Berechnung der Ausgleichskurve mit in Betracht gezogen werden. Denn falls der Algorithmus bei der Erstellung der Ausgleichskurve aus den Messkurven bestimmte Punkte bevorzugt oder stärker ins Gewicht nimmt, kann das die Größe der Abweichungen systematisch verändern, vor allem bei den SCK-Messungen.

Dieser Wert ist ein zusätzlicher Parameter um die Güte der Anpassung der Ausgleichsfunktion

(*Goodness of Fit*) von der gemessenen zu der errechneten Kurve zu bestimmen. Der Parameter zeigt dementsprechend vergleichbare Kurvenverläufe wie der  $\chi^2$  (s. Abb. 20). Für diese Arbeit war ein weiterer Parameter zur Überwachung der Langzeitentwicklung der Werte und zur Validierung des von der Software generierten  $\chi^2$  Wertes sehr nützlich.

#### 4.11.7. Massentransferkonstante

Bei der Ermittlung von kinetischen Daten spielt der Massetransport innerhalb der Flusszelle zwischen Lösung und Oberfläche eine wichtige Rolle. Nur an der Oberfläche des Chips kann das SPR-Signal gemessen werden, das heißt, wenn zwischen der Lösung und der Oberfläche kein Austausch besteht, durch zum Beispiel elektrische Abstoßung, können keine echten kinetischen Daten ermittelt werden, da das System massentransferlimitiert ist. In die Berechnung der  $k_t$  fließen der Diffusionskoeffizient des Analyten, die Flussrate, die Dimensionen der Flusszelle und das molekulare Gewicht des Analyten mit ein.

Die Massentransferkonstante  $k_t$  liegt für Proteininteraktionsmessungen normalerweise im Bereich von  $10^8 \text{ RU} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ , bei nicht massentransferlimitierten Messsystemen sind aber auch Werte bis zu  $10^{12} \text{ RU} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und höher normal [72]. Der  $k_t$  für das  $\beta 2$  Microglobulin System lag in den MCK-Messungen bei etwa  $10^8 \text{ RU} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und damit im akzeptierten Bereich. Für die SCK-Messungen lagen die Werte bei etwa  $10^{21} \text{ RU} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$  und waren damit so unverhältnismäßig hoch für diesen Wert, dass auch hier eine Massentransferlimitierung ausgeschlossen werden konnte [72].

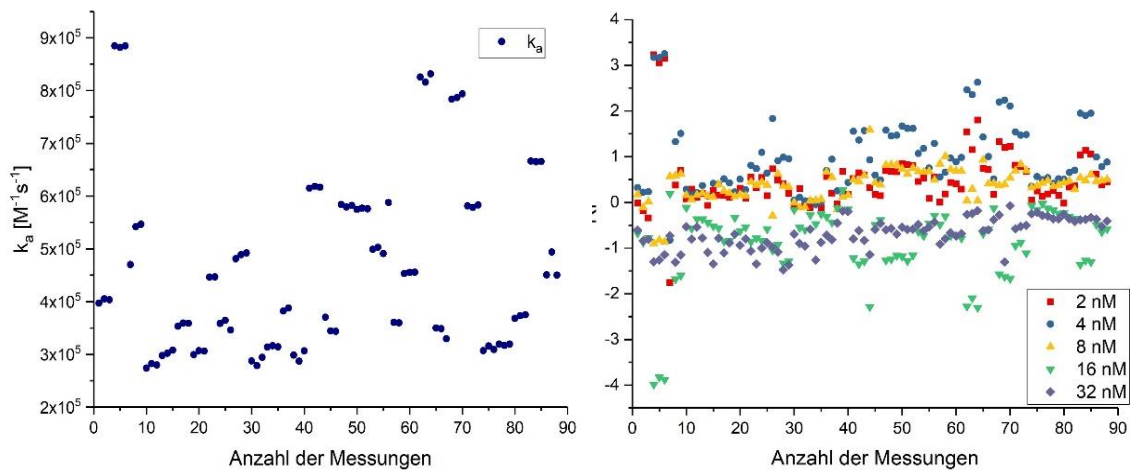
Dem Parameter  $k_t$  wird häufig eine eher geringe Relevanz zugestanden, da er ein sehr großes Gebiet an Werten abdecken kann und dabei nicht die Güte der errechneten Kurve beeinflusst. Gleichwohl hat er eine wichtige Kontrollfunktion, denn wenn Experimente nicht so verlaufen wie erwartet, und der  $k_t$  Wert außerhalb seiner Grenzen liegt, kann das ein direkter Hinweis darauf sein, dass die Experimente eventuell vom Massentransfer limitiert sind [72, 80]. Falls dieser Fehler auftritt muss er in der Methodenentwicklung bearbeitet werden.

#### 4.11.8. Brechungsindex

Der Einfluss der Masse auf den Brechungsindex der Probe wird von der Software als RI ausgegeben. Er basiert auf dem optischen Brechungsindex der Analytenlösung, die über die Messzelle geleitet wird. Der Brechungsindex ist direkt abhängig von der Konzentration des Analyten und der Zusammensetzung des Puffers.

Über die gesamte Messreihe war der RI ein sehr stabiler Parameter. In einigen Fällen zeigte er Ausreißer parallel zu Ausreißern anderer Parameter, wie dem  $R_{\max}$ , den kinetischen Konstanten und  $\chi^2$  (s. Abb. 23). Daraus lässt sich folgern, dass einige dieser Ausreißer durch eine Veränderung der Probenlösung zustande kamen, die nur durch eine falsche Verdünnung des Analyten oder eine geringe Abweichung der Pufferzusammensetzung verursacht werden konnten. Als Schlussfolgerung kann man daraus schließen, dass Ausreißer oder Fehler, die nur

bei den anderen Parametern sichtbar wurden, nicht aus Fehlern in der Verdünnungsreihe stammen können, sondern auf anderen externen oder internen Einflüssen beruhen müssen.



**Abbildung 23:** In der rechten Abbildung ist die Assoziationsratenkonstante über die Anzahl der Messungen dargestellt. In der rechten Abbildung ist die Veränderung des Brechungsindex in den jeweiligen Konzentrationen über die Anzahl der Messungen dargestellt. Sie zeigen bei einigen Messungen wie zum Beispiel um die Messung Nr. 5 und 65 herum zusammenhängende Abweichungen.

#### 4.12. Kontrollkarten

Kontrollkarten sind Standardhilfsmittel zum Beispiel in der Herstellungskontrolle der pharmazeutischen Industrie zur statistischen Prozesskontrolle [27–29]. Dort dienen sie der Überwachung von Parametern oder experimentell ermittelten Werten der Inprozesskontrolle, falls diese, festgelegte Grenzen überschreiten (*Out Of Specification*, OOS) (Vgl. Kap. 2.8). In dieser Arbeit sind diese Kontrollkarten zur Ermittlung der Zusammenhänge von äußeren und instrumentellen Einflüssen für verschiedene Messgrößen der Experimente eingesetzt worden. Verschiedene Arten an Kontrollkarten wurden verwendet, um unterschiedliche

Darstellungen von den Parametern zu zeigen. Ein Beispiel für eine mögliche Kontrollkarte ist die Überwachung eines Wertes über die gesamte Anzahl der Läufe.

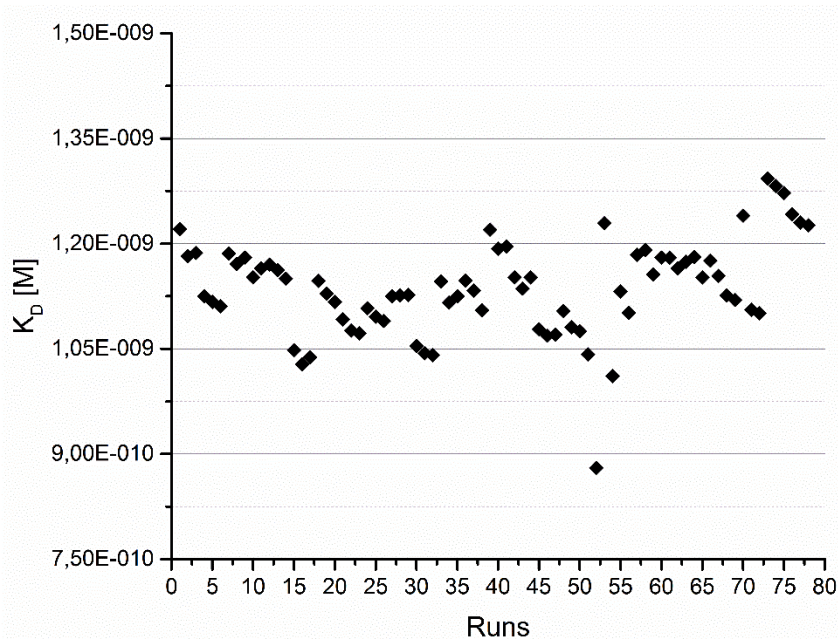


Abbildung 24: Einfache Darstellung der  $K_D$  über die Anzahl der Läufe für die Messreihe SCK Xantec 1.

Auf der y-Achse wird der Zahlenwert des jeweiligen Messwertes und auf der x-Achse die Nummer des Laufes in zeitlicher Reihenfolge aufgetragen. In dieser einfachen Darstellung sind Schwankungen, Tendenzen und Ausreißer gut sichtbar (Abb. 24). Dann wurde diese Darstellung noch weiterbearbeitet, indem alle Ereignisse, die während der Messungen stattgefunden haben, chronologisch eingetragen wurden.

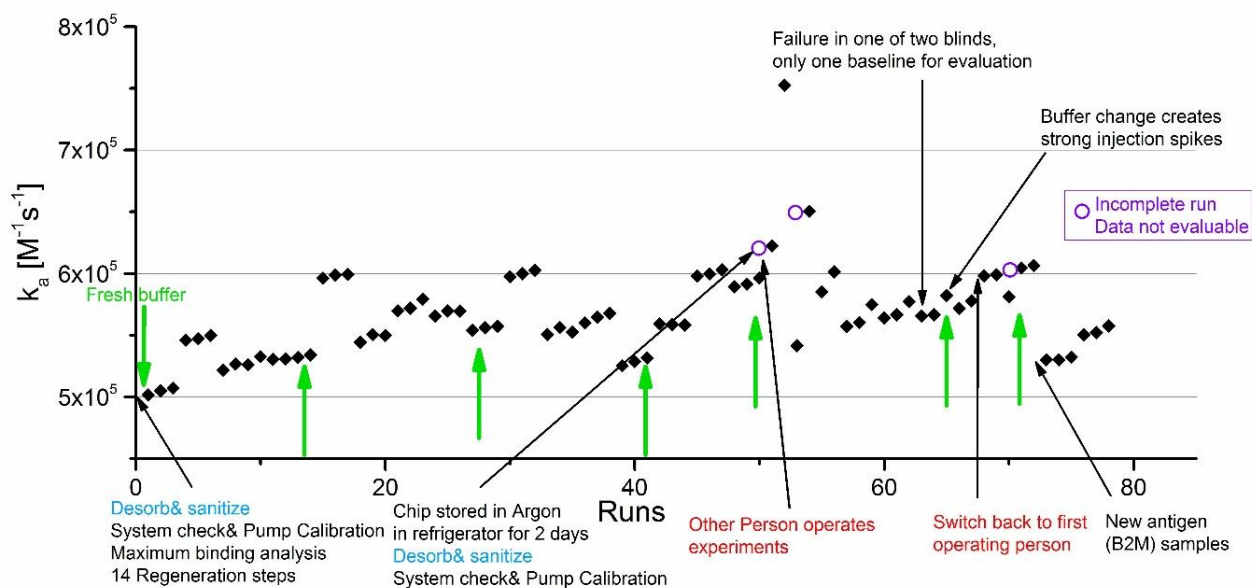


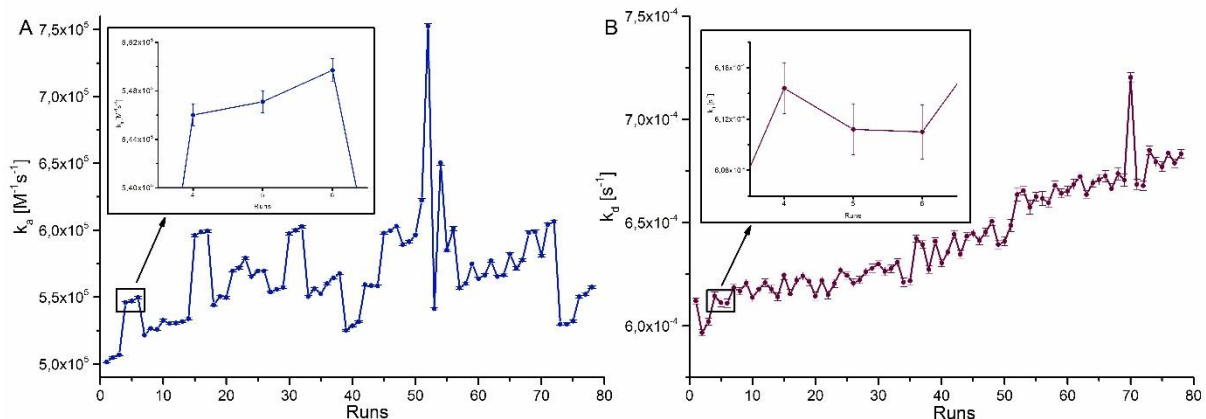
Abbildung 25: Die Darstellung der  $k_a$  über die Anzahl der Läufe der Messreihe SCK Xantec 1 zur Korrelation der Geschehnisse zu den Messwerten.

In dieser Darstellung (Abb. 25) sind Korrelationen erstmals zu erkennen. Die Streuung der Werte ab ca. Lauf 50 schienen zusammenhangslos, aber zieht man durch die Darstellung in Betracht, dass zu dem Zeitpunkt ein Bedienerwechsel stattgefunden hat und vorher die Lagerung des Chips im Kühlschrank erfolgte, erklärt sich diese Streuung. Weiterhin ist hilfreich, dass mithilfe dieser Kontrollkarte auch Einflussfaktoren ausgeschlossen werden können, zum Beispiel der regelmäßige Pufferwechsel. Beim Pufferwechsel wurde immer ein frisch hergestellter Puffer eingesetzt. Dabei können beim Pufferwechsel kleine Schwankungen im Gehalt der Puffersubstanzen auftreten. Allerdings sind in dieser Kontrollkarte keine Einflüsse dieser möglichen Schwankungen sichtbar. Das lässt darauf schließen, dass diese Schwankungen durch die Blindläufe und die Referenzmesszelle für jede einzelne Messung herausgefiltert wurden.

Eine weitere Variante einer Kontrollkarte, mit der man direkt die Qualität der einzelnen Sensorchips vergleichen kann, erhält man durch die Darstellung der Messwerte eines Parameters, welcher mit verschiedenen Chips gemessen wurde, (s. Abb. 15 und 19). In dieser kann man die Entwicklung der Parameter sehr gut darstellen. Sie zeigt die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Tendenzen oder Streuung und lässt einen Gesamtüberblick zu. Bei Abbildung 15 sind zum Beispiel die unterschiedlichen Startlevel bei gleichem Immobilisierungsprotokoll gut zu vergleichen und auch die gemeinsamen Abnahmetendenzen über die Gesamtnutzungsdauer. Die Streuung der  $R_{\max}$  Werte von MCK2 und die Gleichmäßigkeit der von MCK1 sind in dieser Darstellung, auch durch die Nivellierung durch die gleiche y-Skala, deutlicher und besser einzuschätzen.

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  bietet noch eine weitere Darstellungsmöglichkeit, die viel zum Verständnis der Werte hinzufügen kann (s. Abb. 19). Die  $K_D$  ist der Quotient aus der Dissoziations- und Assoziationsratenkonstante. Da diese beiden Werte aus den Kurven ermittelt wurden, können diese einzeln auf den x- und y-Achsen auftragen werden, welche als Kombination dann den  $K_D$ -Wert ergeben. Daraus kann bei Schwankungen des  $K_D$ -Wertes direkt abgelesen werden, welcher Parameter ( $k_d$  oder  $k_a$ ) in dem Fall schwankt oder ob eine gemeinsame Verschiebung in beiden Werten vorliegt. Im Gegenzug kann man in dieser

Darstellung auch verfolgen, wenn der  $K_D$ -Wert gleichbleibt, aber die Ratenkonstanten sich entgegengesetzt verändern, und damit der Quotient gleichbleibt.



**Abbildung 26:** Rechts ist die  $k_a$  und links die  $k_d$  über die Anzahl der Läufe der SCK Xantec 1 dargestellt. Jeweils sind einzelne Punkte hervorgehoben um die Balken der SE sichtbar zu machen.

In der Abbildung 26 der beiden Ratenkonstanten findet sich eine weitere Darstellungsmöglichkeit. Hier wurden die jeweiligen Werte mit den dazugehörigen Standardfehlern (SE) abgebildet. Da diese Standardfehler allerdings sehr klein waren und in der Skalierung kaum erkennbar sind, ist ein Ausschnitt von drei Messwerten vergrößert worden, um die Größe der SE's besser einschätzen zu können. Sie dienen der Überwachung der Ratenkonstanten.

#### 4.13. Pipettenkalibrierung und Verdünnungsreihenoptimierung

In der zugrundeliegenden Arbeitsanweisung des *Getting Started Kits* ist eine klassische Reihenverdünnung für die Verdünnungsreihe des Antigens vorgesehen (Tab. 3). Diese Reihenverdünnung hat Vor- und Nachteile. Die Vorteile sind, dass nicht sehr viele Pipettengrößen benötigt werden und diese Pipetten müssen nur selten verstellt werden. Die Nachteile allerdings sind, dass sich in einer Reihenverdünnung die systematischen Pipettenfehler [81] multiplizieren (vgl. Tab. 4). Die zufälligen Pipetten- oder Pipettierfehler können nicht genau quantifiziert werden und müssen zu dem systematischen Fehler hinzugerechnet werden. Aufgrund des hohen Fortpflanzungsfehlers wurde ein neues Verdünnungsprotokoll erarbeitet, welches nicht weiter auf einer Reihenverdünnung basierte (Tabelle 2). Im neuen Protokoll wurden alle Konzentrationen aus der 128 nM Lösung hergestellt. Diese Vorgehensweise senkte die Fortpflanzung des systematischen Pipettenfehlers deutlich (von 15,48 auf maximal 6,65 %), bringt allerdings auch die Nachteile, dass mehr Pipetten benötigt werden und die Pipetten häufiger verstellt werden müssen. Das Verstellen der Pipetten wird hier erwähnt, weil angenommen wird, dass das häufige Verstellen der Pipettenvolumina deren Präzision mindert.

Eppendorf-Pipette [ $\mu\text{L}$ ]	Pipettiertes Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Relative systematische Abweichung [%]	Absolute systematische Abweichung [ $\mu\text{L}$ ]
0,5 – 10	9	1,5	0,135
2 - 20	15	1,2	0,18
10 - 100	30	3	0,9
	60	1	0,6
20 - 200	120	1	1,2
100 - 1000	240	3	7,2
	591	1	5,91
	720	1	7,2
	840	1	8,4
	900	1	9
	930	1	9,3
	945	1	9,45

Tabelle 2: Neues Verdünnungsreihenprotokoll mit den jeweiligen Pipetten, den zu pipettierenden Volumina mit den dazugehörigen systemischen Abweichungen.

Eppendorf-Pipette [ $\mu\text{L}$ ]	Pipettiertes Volumen [ $\mu\text{L}$ ]	Relative systematische Abweichung [%]	Absolute systematische Abweichung [ $\mu\text{L}$ ]
0,5 - 10	9	1,5	0,135
100 - 1000	300	3	9
	591	1	5,91
	600	1	6
	900	1	9

Tabelle 3: Vorheriges Verdünnungsreihenprotokoll des *Getting Started Kits* mit den benötigten Pipette, den zu pipettierenden Volumina und den dazugehörigen systematischen Abweichungen.

	Altes Verdünnungsprotokoll	Neues Verdünnungsprotokoll
Konzentration [nM]	Gesamter systematischer Fehler [%]	
32	6,65	6,65
16	8,79	4,58
8	10,97	4,58
4	13,21	6,65
2	15,48	4,78

Tabelle 4: Gegenüberstellung der Summen der systematischen Fehler des alten und neues Protokolls für die jeweiligen Konzentrationen der Analytlösungen.



#### **4.14. Erarbeitung einer Standardarbeitsanweisung**

Ein Abschnitt dieser Arbeit bestand aus der Erstellung einer Arbeitsanweisung für eine einfache und präzise Methode für die Gerätequalifizierung unter besonderer Beachtung der Leistungsqualifizierung (s. Kap. 2. und insbesondere Kap. 2.7.).

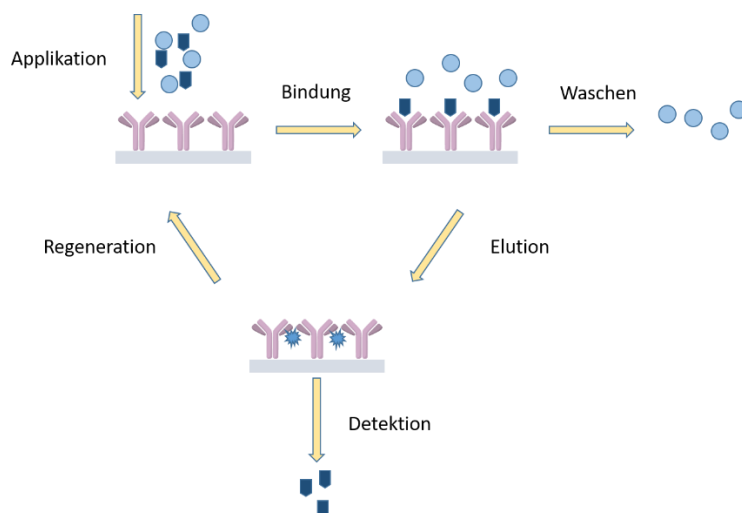
Aus den verschiedenen Messreihen wurde die MCK1 als Grundlage ausgewählt. Die MCK1 hatte aufgrund der festgesetzten und unveränderten Sequenz an Analytinjektionen die höchste Präzision der gemessenen Reihen. Da für die Leistungsqualifizierung eine höhere Präzision gewichtiger ist als die Richtigkeit der gemessenen Werte, war die feste Sequenz der ausschlaggebende Punkt (s. MCK1 in Tabelle 1). Daraufhin wurde aus der grundlegenden Methode des *Getting Started Kits* vom Biacore X100 und den eigenen Veränderungen eine Standardarbeitsanweisung erarbeitet und veröffentlicht [82] (s. Kap. 7.1.9.).

## 5. Hochleistungsaffinitätschromatographie

### 5.1. Affinitätschromatographie

#### 5.1.1. Einführung

Das Feld der Affinitätschromatographie umfasst viele unterschiedliche Anwendungsmöglichkeiten in der Flüssigchromatographie. Eine der Hauptanwendungen und ursprünglichsten Anwendungen ist die Aufreinigung von Gemischen biologischer Substrate mittels einer Säule, die mit einem Material gepackt ist, an dem ein Ligand kovalent gebunden ist. Dieser Ligand bindet einen der Bestandteile spezifisch über Wechselwirkungen, daher nicht kovalent, und trennt ihn damit von den anderen Bestandteilen der ursprünglichen Lösung. Nach dem die Säule bzw. der Ligand mit dem Analyten beladen ist, wird mittels eines Elutionsmittels, welches anhand dessen Elutionskraft die Bindung zwischen Ligand und Analyt trennen kann, der Analyt in aufgereinigter Form im Eluat aufgefangen. Danach erfolgt bei Bedarf eine Regeneration des Liganden an der Säule, um diesen wieder in seine aktive (analytenbindende) Form zu überführen.



**Abbildung 27: Graphisches Schema der Abläufe bei der Affinitätschromatographie.**

Zur Auswahl bei den Liganden stehen sowohl organische als auch anorganische. Diese können dann auch noch in spezifische und unspezifische unterteilt werden. Die Auswahl des Liganden wird dann je nachdem wofür die Affinitätschromatographie eingesetzt wird getroffen. Als hochselektive Liganden sind die Antikörper zu nennen, sie können im besten Falle ein einziges Molekül aus einem großen Gemisch extrahieren oder auch noch sehr nahe Verwandte. Weiterhin noch spezifisch, aber schon ein größeres Gebiet, erfassen die Proteine A und G. Die Proteine A und G, aus den Zellwänden von *Staphylococcus* und *Streptococcus* Arten gewonnen, haben die Eigenschaft den Fc-Teil von humanen IgG Antikörpern zu binden und so zum Beispiel eine Aufreinigung dieser Molekülklasse zu ermöglichen. Weitere mögliche Liganden für die Affinitätschromatographie wären Metallionen als Chelatbinder, Lektine und Proteine [83, 84].

Eine weitere grundlegenden Frage ergibt sich bei der Wahl des Säulenmaterials. Es soll möglichst inert aber chemisch so veränderbar sein, dass man die Liganden kovalent binden kann. Außerdem sollte das Material möglichst wenig unspezifische Bindungen mit den Analyten eingehen und es muss dem Druck und Fluss des jeweiligen Chromatographiesystems standhalten können. Als Beispiele sind die klassischen Agarose- und Cellulosesäulen zu nennen und für Hochdrucksysteme, Polystyrensäulen und Siliciumdioxid-, als gepackte oder Monolithsäule.

### 5.1.2. Analytische Affinitätschromatographie

Die Analytische Affinitätschromatographie (AAC) oder auch Hochleistungsaffinitätschromatographie (HPAC) dient nicht mehr wie die klassische Affinitätschromatographie der Aufreinigung zur Weiterverwendung, sondern wurde entwickelt zur Bestimmung von Affinitäten/Bindungskonstanten, Kinetiken und dem thermodynamischem Verhalten von biologischen Systemen. Sie wird auch noch zur Aufreinigung genutzt, allerdings dann nur noch zum Beispiel zur chiralen Trennung von Stoffen in der Qualitätskontrolle [85].

Innerhalb der AAC existieren viele verschiedene Möglichkeiten die jeweils gewünschten Parameter zu bestimmen. Die beiden am häufigsten genutzten Methoden sind die sogenannte *Zonal Elution* und die *Frontal Affinity Chromatography* (FAC). Die Methoden unterscheiden sich in der Aufladung der Säule, der Elution und in der Konzentration des Analyten.

In der *Zonal Elution* Methode werden Lösungen von Analyten klassisch injiziert und in einzelnen Läufen auf die Säule gegeben. Die Retentionszeit und Peakform der Peaks ergibt dann eine Aussage über die Kapazität und das Bindungsverhalten von Analyten und Ligand. Mit dieser Methode können unterschiedliche Bindungsverhalten verschiedener Analyten über den gleichen Liganden verglichen werden. Außerdem können Veränderungen der Reaktionsbedingungen wie zum Beispiel pH-Wertänderungen untersucht werden.

In der FAC werden verschiedene Konzentrationen eines Analyten auf die Säule gegeben, allerdings wird hier nicht klassisch injiziert sondern kontinuierlich über den Fließmittelzugang appliziert. Dadurch bildet sich, sobald alle Bindungsplätze des Liganden in der Säule besetzt sind, eine sogenannte Durchbruchkurve. Aus den Formen der Durchbruchkurven und Plateaus der unterschiedlichen Konzentrationen können dann Bindungsdaten und Säulenkapazitäten bestimmt werden [83, 86].

## 5.2. Säulenmaterial

Monolithische Säulen sind hochporöse monolithische Kristalle aus Kieselgel. Sie bestehen aus Makro- und Mesoporen und einer hohen Anzahl an Kanälen innerhalb des Kristalls. Sie zeichnen sich durch eine hohe Robustheit und eine größere Oberfläche gegenüber partikulären Säulen aus [87].

Die Chromolith® Epoxy Säulen der Firma Merck, welche verwendet wurden, haben eine totale Porosität von etwa 80 %, einen Innendurchmesser von 4,6 mm, sind PEEK ummantelt und können Drücke bis zu 200 bar widerstehen [88]. Die Säulen wurden für die Experimente von der Firma auf eine Länge von 5 mm geschnitten um den Verbrauch von Ligand und Analyt

möglichst gering zu halten. Die Kieselgeloberfläche wurde mit Epoxygruppen derivatisiert, so dass sie für die Immobilisierung von Liganden für diese Experimente leichter zugänglich war.



Abbildung 28: Die Micromonolithsäule zum Größenvergleich neben einem 1,5 mL Eppendorf-Vial.

### 5.3. Säulenimmobilisierung

Für die Chromolith® Säulen von Merck gibt es vier grundsätzliche Strategien zur Immobilisierung von Liganden mit Aminen als Endgruppe.

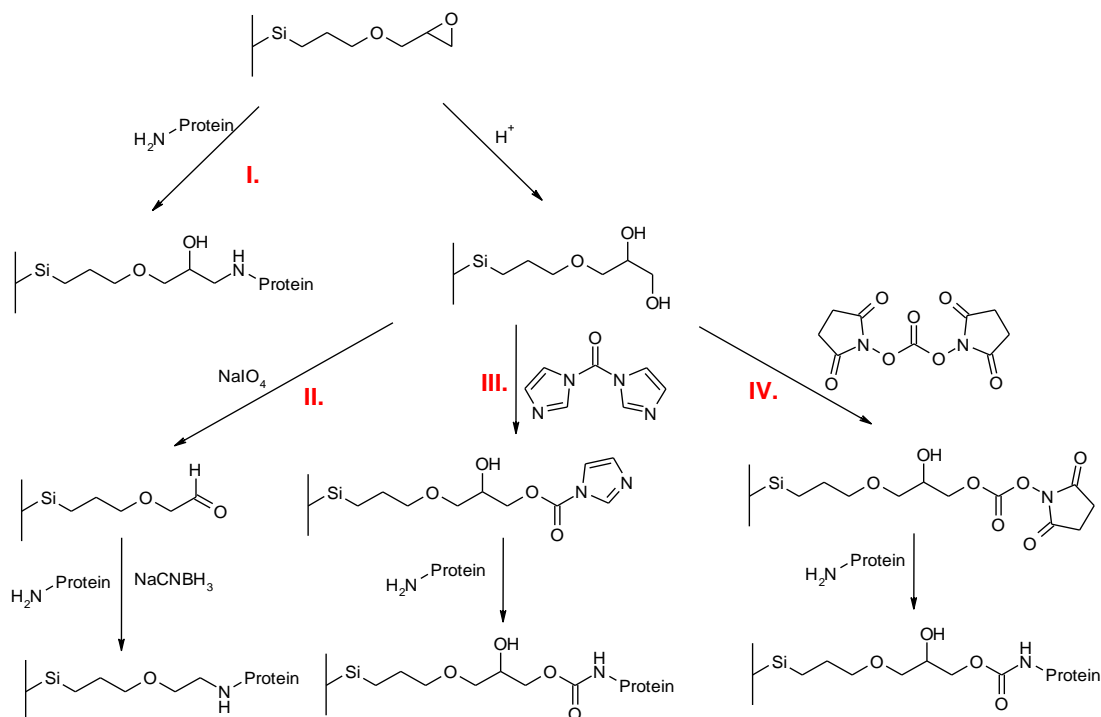
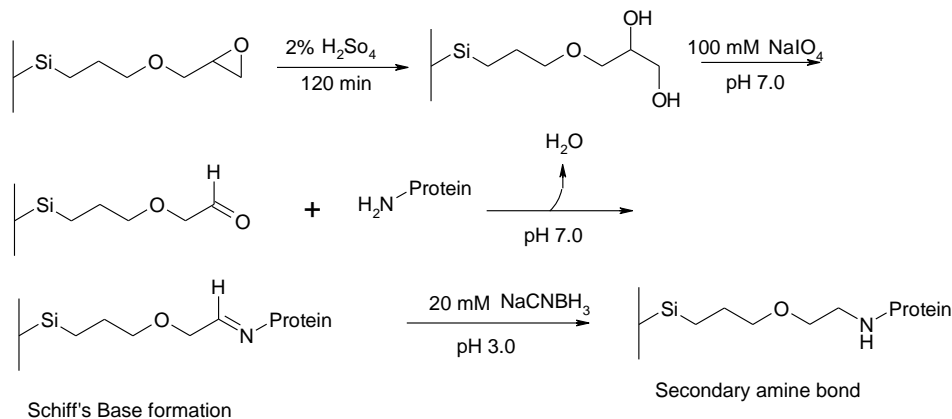


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Immobilisierungsmöglichkeiten der Chromolith Säulen [89]. I. Direkte Kopplung der Amingruppe des Proteins mit dem Epoxid des Säulenmaterials. Nach Hydrolyse des Epoxids. II. Oxidation des Diols zum Aldehyd und damit Schiff'sche Base-Kopplung mit dem Amin des Proteins und anschließende Reduktion zum sekundären Amin. III. Umsetzung des Diols mittels Carbonyldiimidazol (CDI) in ein Urethan und anschließenden Austausch des verbliebenen Imidazols durch das Amin des zu koppelnden Proteins. IV. Direkte Aktivierung des Diols mittels  $N,N'$ -Disuccinylcarbonat (DSC) über ein Hydroxamsäurederivat und anschließender Kopplung des Amins aus dem Protein unter Abspaltung des Succinimids zu einem Carbamat (=Urethan).

Die vier Immobilisierungsstrategien sind bereits verglichen worden und die Schiffsche Base-Reaktion erbrachte die besten Resultate [90].

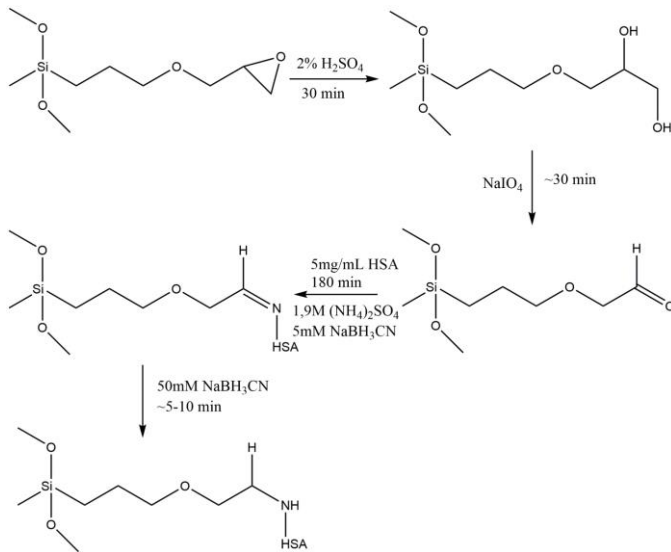
Für die Versuchsreihe wurde dementsprechend Humanes Serum Albumin (HSA) mit Hilfe der Schiffschen Base-Reaktion (Reaktion Nr. II aus Abb. 29) an die Epoxygruppen der Monolithen gekoppelt. Innerhalb dieser Reihe wurden zwei verschiedene Säulen hergestellt. Die erste Säule wurde nach dem Protokoll der Abbildung 30 hergestellt.



**Abbildung 30: Mechanismus der Aktivierung, Kopplung und Reduktion der Chromolith-Säule [89].** Als erstes wird das Epoxid mit zweiprozentiger Schwefelsäure zum 1,2-Diol hydrolysiert. Darauf folgt eine Oxidation mit 0,1 M Natriumperoxid Lösung bei pH 7,0 zu einem Aldehyd. Danach wird durch Zugabe des Proteins mit dessen Amingruppe über ein instabiles Halbaminal eine Schiffsche Base (Imin) gebildet. Da diese Schiffsche Base zu reaktionsanfällig ist, wird diese im nächsten Schritt mit dem 20 mM milden Reaktionsmittel Natriumcyanoborhydrid bei pH 3,0 zu einem sekundären Amin reduziert.

Die Epoxy-Gruppen reagieren mit Hilfe von zweiprozentiger Schwefelsäure zum Diol, welche dann mit Natriumperiodat-Lösung zum Aldehyd oxidiert werden. Das Aldehyd reagiert in der Folge mit der namensgebenden Schiff'sche Base-Reaktion mit dem Amin des Liganden. Danach wird die Schiff'sche Base mit dem milden Reduktionsmittel Natriumcyanoborhydrid zum sekundären Amin reduziert. Sekundäre Amine sind chemisch stabiler als Schiffsche Basen und bilden somit langlebigere immobilisierte Säulen.

Die zweite Säule wurde nach einem neuen Protokoll vom Säulenhersteller Merck hergestellt, dieses befand sich zu diesem Zeitpunkt noch in der Entwicklung (Abb. 31).



**Abbildung 31: Modifiziertes Immobilisierungsprotokoll nach Abb. 30. Es wird bereits bei der Schiffchen Base-Reaktion in den Puffer ein kleiner Anteil (5 mM) Natriumcyanoborhydrid und 1,9 M Ammoniumsulfat hinzugegeben.**

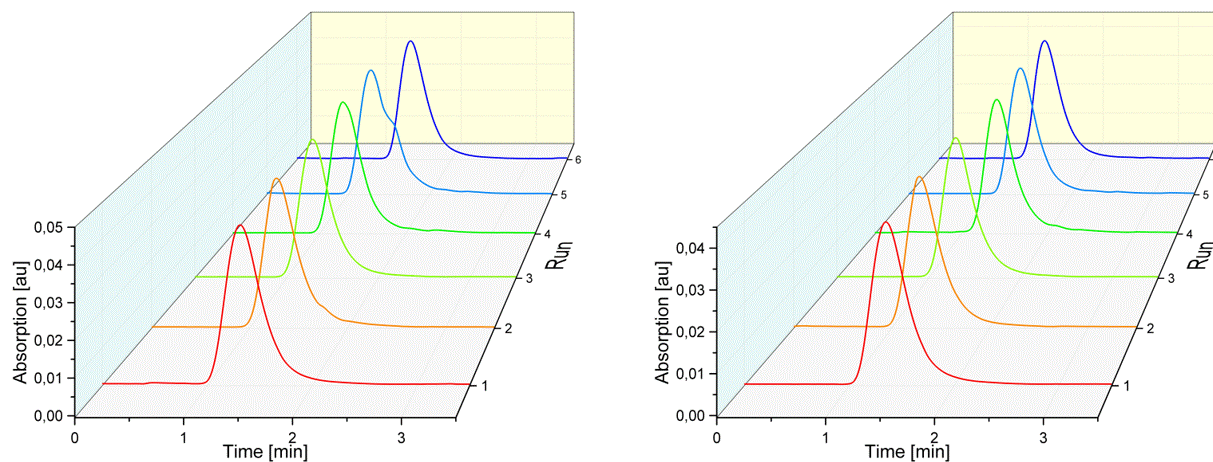
Im Unterschied zum ersten Protokoll wird bei diesem zeitgleich mit dem Liganden eine hochmolare Ammoniumsulfat Lösung und eine kleine Menge Reduktionsmittel über die Säule gegeben. Die hochmolare Salzlösung bringt das Protein zur Anlagerung an die Oberfläche bzw. zum Ausfällen auf der Oberfläche der Säule und ermöglicht damit eine höhere Beladung der Säule mit dem Liganden.

#### 5.4. Chirale Trennung von D- und L-Tryptophan

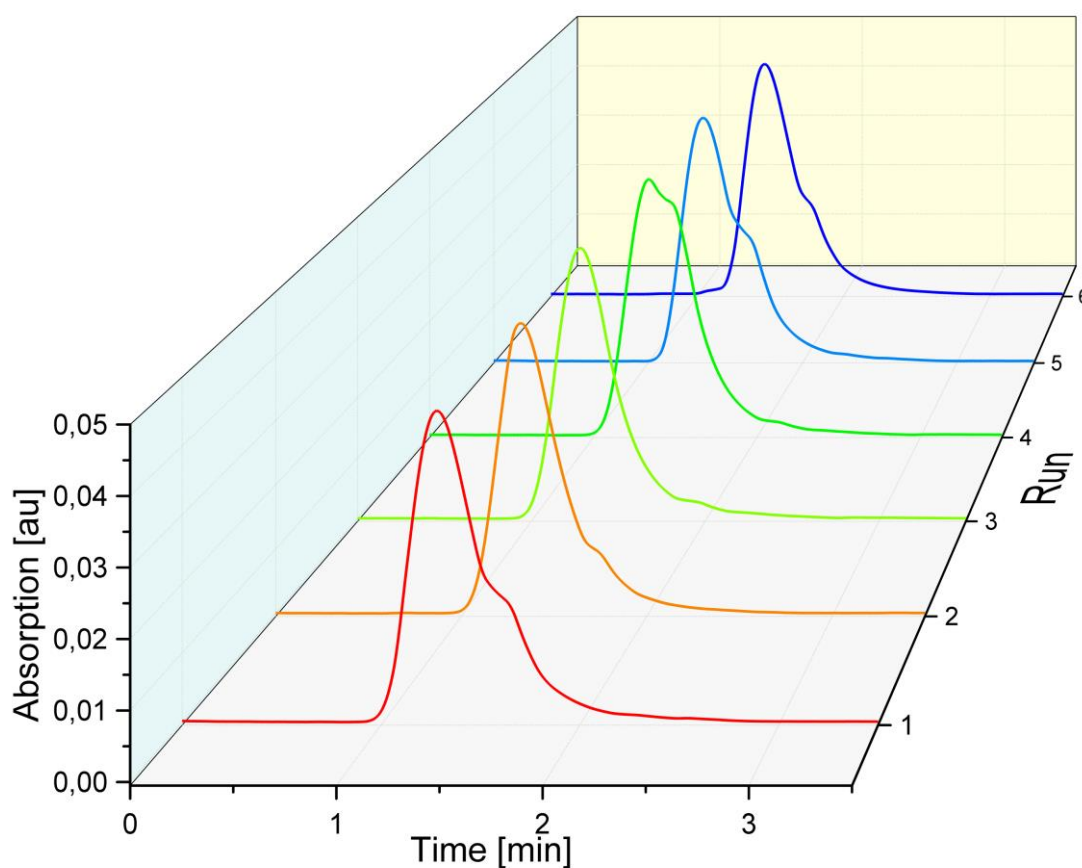
Zur Überprüfung der Immobilisierungsprotokolle wurde die chirale Trennung von D- und L-Tryptophan durchgeführt.

Das humane Serumalbumin besitzt mehrere gut beschriebene stereoselektive Bindungsstellen für Enantiomere, etwa die Warfarinbindestelle. Darunter ist auch eine Bindetasche, die

spezifisch für indolhaltige Moleküle ist. Diese Bindetasche bindet L-Tryptophan deutlich stärker als D-Tryptophan, was die Trennung der beiden Enantiomere ermöglicht [91].

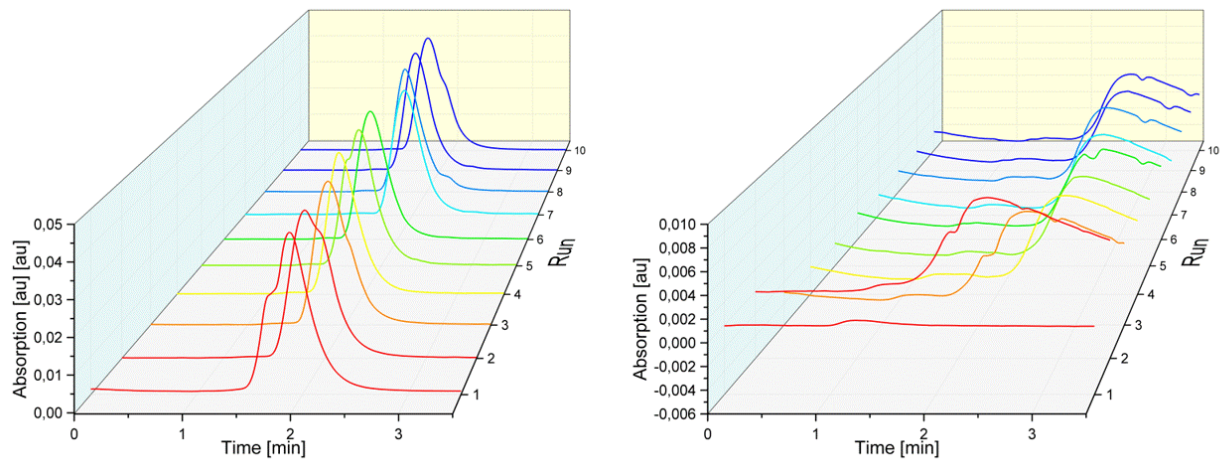


**Abbildung 32:** Es sind jeweils sechs Läufe über die erste Säule von (links) D-Trp und (rechts) L-Trp mit deren Absorption über die Laufzeit dargestellt.



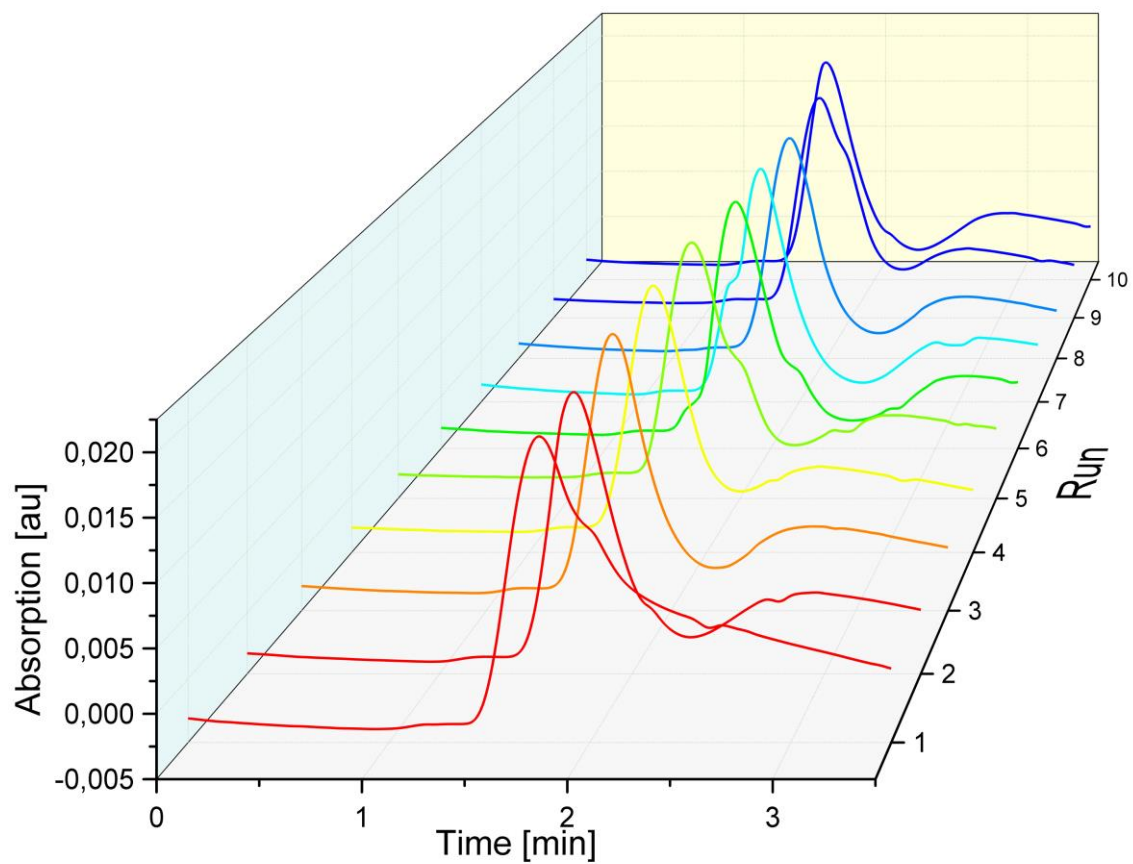
**Abbildung 33:** Sechs Läufe in denen die Mischung aus D- und L-Trp über die erste Säule vermessen wurde.

Das erste Immobilisierungsprotokoll erbrachte keine Basislinientrennung der beiden Enantiomere. Beide eluieren zur gleichen Zeit, was bedeutet, dass nicht genug HSA auf der Säule gebunden wurde um das L-Tryptophan signifikant stärker zu binden und damit dessen Retentionszeit zu erhöhen (Abb. 33).



**Abbildung 34:** Jeweils zehn Läufe von links D-Trp und rechts L-Trp gemessen auf der zweiten Säule.





**Abbildung 35:** Zehn Läufe zur Trennung der Mischung aus D- und L-Trp auf der zweiten Säule mit einem Fluss von 0,15 mL.

Die zweite Säule, mit neuem Immobilisierungsprotokoll, zeigte schon bei den einzelnen Enantiomeren (Abb. 34) grundsätzlich andere Peakformen. Diese waren bedingt durch die Retention und in der Kombination (Abb. 35) zeigte sich dann auch schon eine deutlichere

Trennung. Optimiert wurde diese Trennung durch eine etwas schnellere Flussrate von 0,5 mL zu vorher 0,15 mL (Abb. 36).

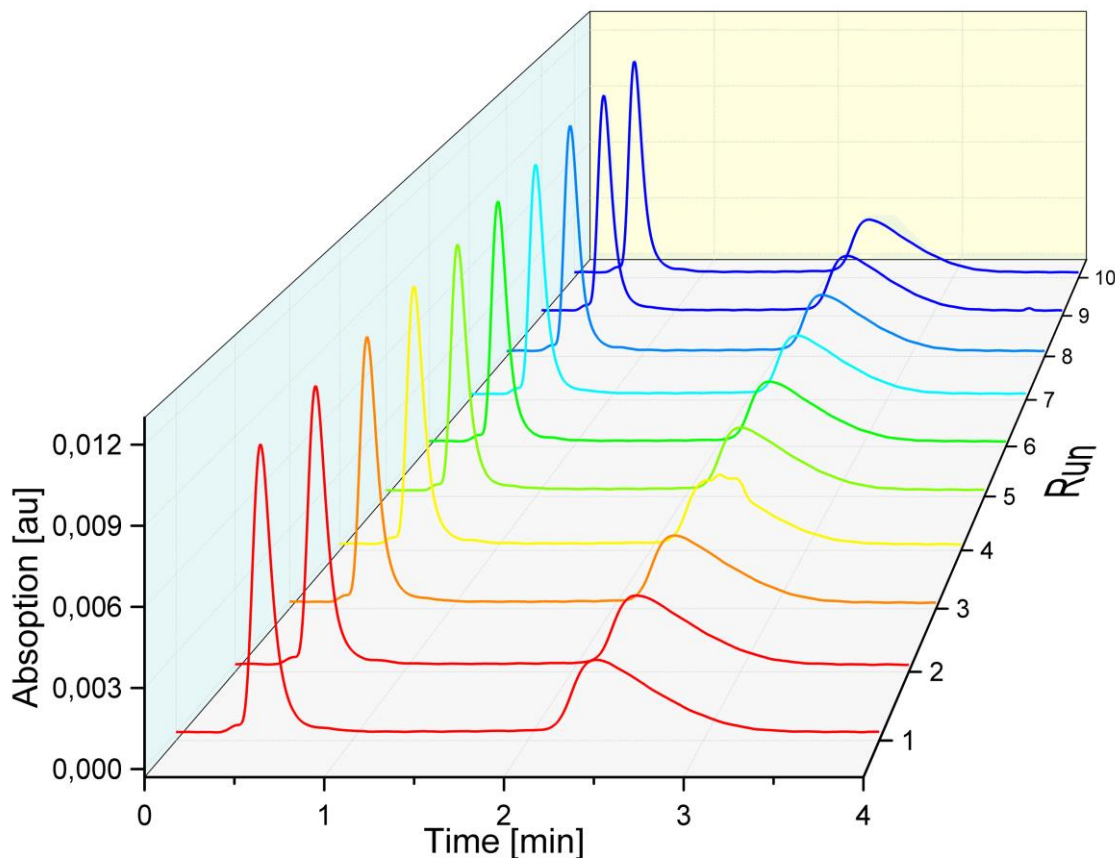


Abbildung 36: Zehn Läufe zur Trennung der Mischung aus D- und L-Trp auf der zweiten Säule mit einem Fluss von 0,5 mL.

### 5.5. FAC mit Carbamazepin zur Bestimmung von Bindungskonstanten [92]

In der Literatur wird unter anderem Carbamazepin häufig als Referenzsubstanz benutzt, um Bindungskonstanten mit HSA zu studieren und zu kalibrieren. Die Arbeitsgruppe um Vuignier [86] hat für Carbamazepin einen Bindungsanteil von 75 % ermittelt. Die Arbeitsgruppe um Hage hat im Allgemeinen einen großen Anteil an der Forschung zu HPAC und auch zu HSA und Carbamazepin mit FAC [93]. Daran angelehnt entstand die Idee, die Arbeit von selbst hergestellten Micromonolithsäulen auf die industriell hergestellten Mikromonolithsäulen von Merck (Chromolith®) zu übertragen und die Vergleichbarkeit auch der Messsysteme im Allgemeinen zu überprüfen.

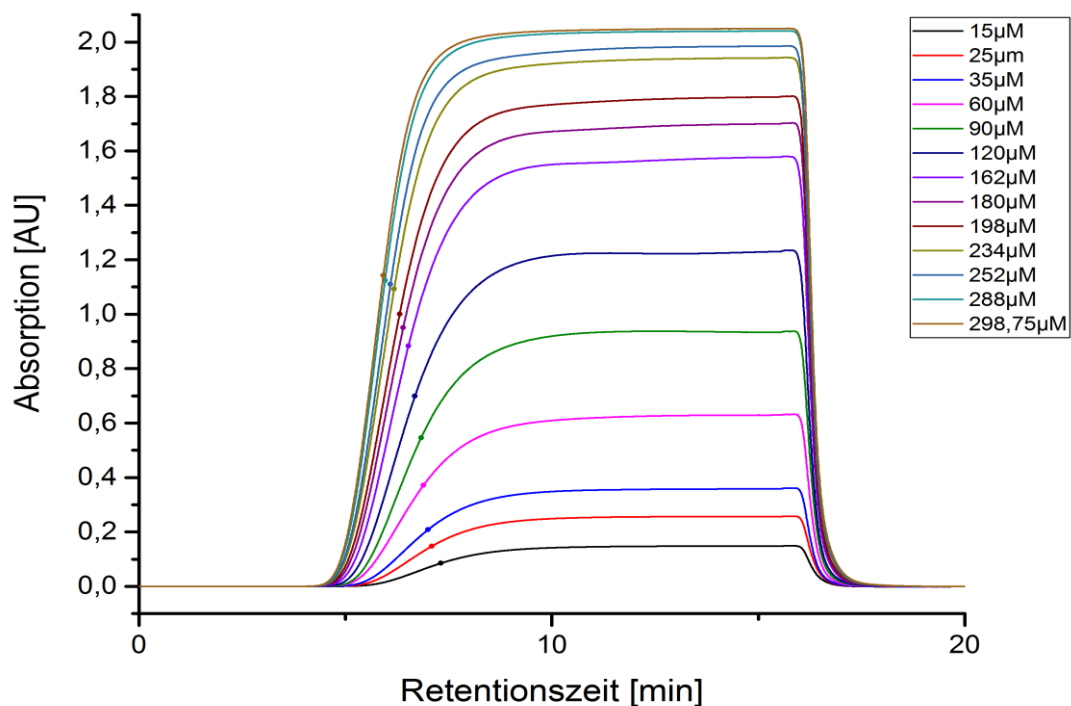
Humanes Serumalbumin wird sehr häufig und gerne als Modellprotein genutzt, da es bereits sehr gut untersucht ist und als ein Hauptbestandteil des menschlichen Blutes für viele Arzneistoffe als Trägerprotein hochrelevant ist.

Wie in Kapitel 5.1.2 bereits kurz erwähnt, kann man mit Hilfe der FAC Bindungskonstanten bestimmen. Durch die kontinuierliche Applikation des Analyten über das Fließmittel entsteht

eine Durchbruchkurve mit einem sigmoidalen Kurvenverlauf, die mit einer Plateaubildung endet. Jede Konzentration hat eine spezifische Durchbruchzeit (Abb. 37). Zu diesem Zeitpunkt liegt die gleiche Stoffmenge Carbamazepin gebunden am HSA als auch ungebunden vor. Diese Stoffmenge ( $m_{Lapp}$ ) lässt sich durch die Multiplikation der Netto-Durchbruchzeit mit der applizierten Konzentration und der Flussrate berechnen.

$$m_{Lapp(i)} = t_{i\ netto} [min] \cdot c_i \left[ \frac{nmol}{mL} \right] \cdot flow \left[ \frac{mL}{min} \right]$$

**Formel 4:** Gleichung zur Bestimmung von  $m_{Lapp(i)}$ , der Stoffmenge an Carbamazepin zum Durchbruchzeitpunkt wo  $t_{i\ netto}$  die Netto Durchbruchzeit der applizierten Lösung ist,  $c_i$  die Konzentration der applizierten Lösung und  $flow$  ist die angewendete Flussrate.



**Abbildung 37:** Darstellung der Durchbruchkurven für Carbamazepin in den Konzentrationen von 15-298,75 µM. Es ist die Absorption gegen die Retentionszeit aufgetragen. Die Durchbruchzeit ist durch einen kleinen Punkt auf der Kurve gekennzeichnet.

Um die Bindungshyperbole (Abb. 39) möglichst genau beschreiben zu können, sollten die Konzentrationen der Lösungen für die Messpunkte den Bereich des 0,1- bis 10-fachen des  $K_D$ -Wertes umfassen. Für die höchste Konzentration muss die geringe Löslichkeit von Carbamazepin berücksichtigt werden. Für die niedrigste Konzentration sind die Grenzen des Detektors zu beachten.

Für die Berechnungen muss  $m_{Lapp}$  bei maximaler Analyt-Konzentration bestimmt werden.

Hierfür wird die reziproke Analyt-Konzentration gegen den reziproken Wert des korrespondierenden  $m_{Lapp(i)}$  aufgetragen (Abb. 38). Der Ordinatenabschnitt der Regressionsgeraden beschreibt den Reziprok-Wert von  $m_{Lapp}$  bei einer theoretisch unendlichen Analyt-Konzentration ( $m_L$ ) [93].

$$R'' = \frac{R_i - R_f}{R_c - R_f} = \frac{(t_i - t_0) \times c_i \times flow - (t_f - t_0) \times c_f \times flow}{(t_i - t_0) \times c_c \times flow - (t_f - t_0) \times c_f \times flow}$$

**Formel 5: Gleichung zur Bestimmung des Response-Wertes  $R''$  wobei  $R_i$  für die chemische Veränderung bei der Konzentration  $i$  steht,  $R_c$  für die chemische Veränderung bei einer theoretisch unendlichen Konzentration,  $R_f$  für die chemische Veränderung ohne Ligand (also Referenz),  $t_i$  steht für die Durchbruchzeit bei einer Konzentration von  $i$ ,  $t_0$  für die Totzeit,  $t_f$  für die Durchbruchzeit ohne Ligand,  $c_i$  für die Konzentration  $i$ ,  $c_c$  für die theoretisch unendliche Konzentration und  $c_f$  für die Konzentration  $c_0$ .**

$$t_f \times c_f = 0$$

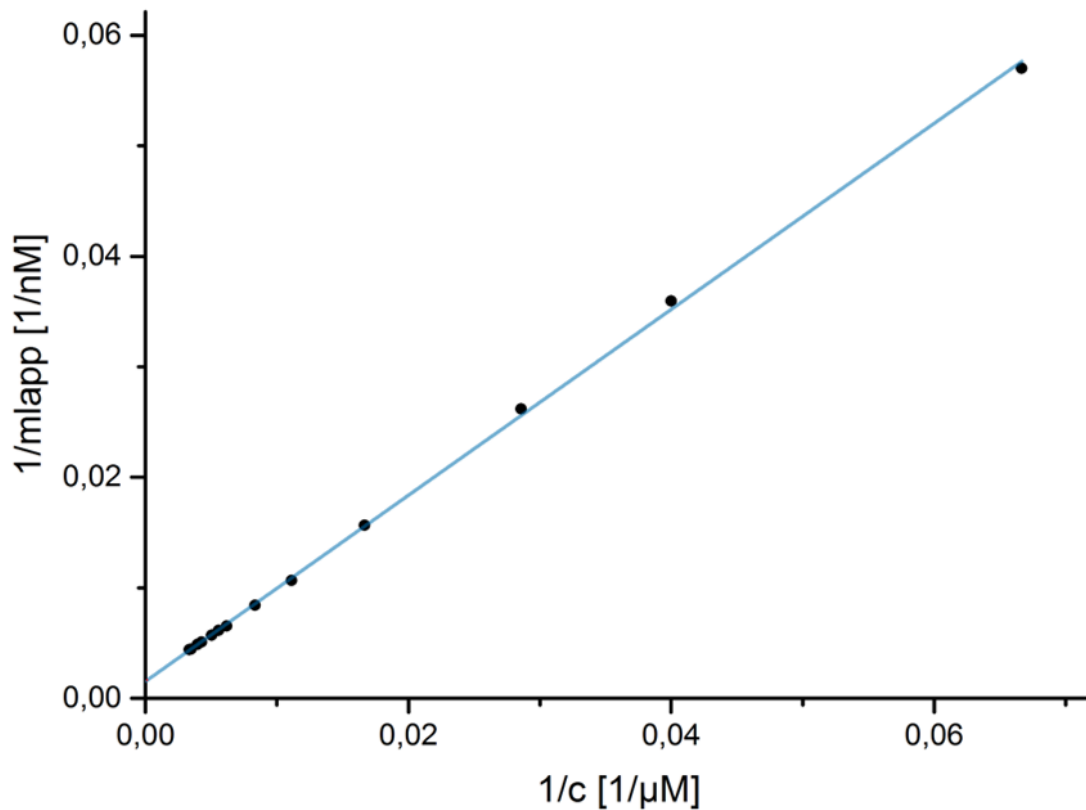
**Formel 6:  $t_f$  ist die Durchbruchzeit ohne immobilisierten Liganden. In der FAC ist der *Shift* umgekehrt proportional, was bedeutet das  $c_f$   $c_0$  entspricht.**

$$R'' = \frac{R_i - R_f}{R_c - R_f} = \frac{(t_i - t_0) \times c_i \times flow}{(t_i - t_0) \times c_c \times flow} = \frac{m_{Lapp}}{m_L}$$

**Formel 7: Berechnung des Response-Wertes  $R''$  wobei  $m_{Lapp}$  für die maximale Analytkonzentration und  $m_L$  für die aktiven Ligandenbindungsstellen der Säule steht.**

$$m_L = \lim_{c \rightarrow \infty} m_{Lapp}$$

**Formel 8: Gleichung zur Berechnung der maximal aktiven belegbaren Ligandenbindungsstellen auf der Säule  $m_L$ , wobei  $m_{Lapp}$  für die maximale Analytkonzentration steht und  $c$  für die theoretisch maximal erreichbare Analytkonzentration.**

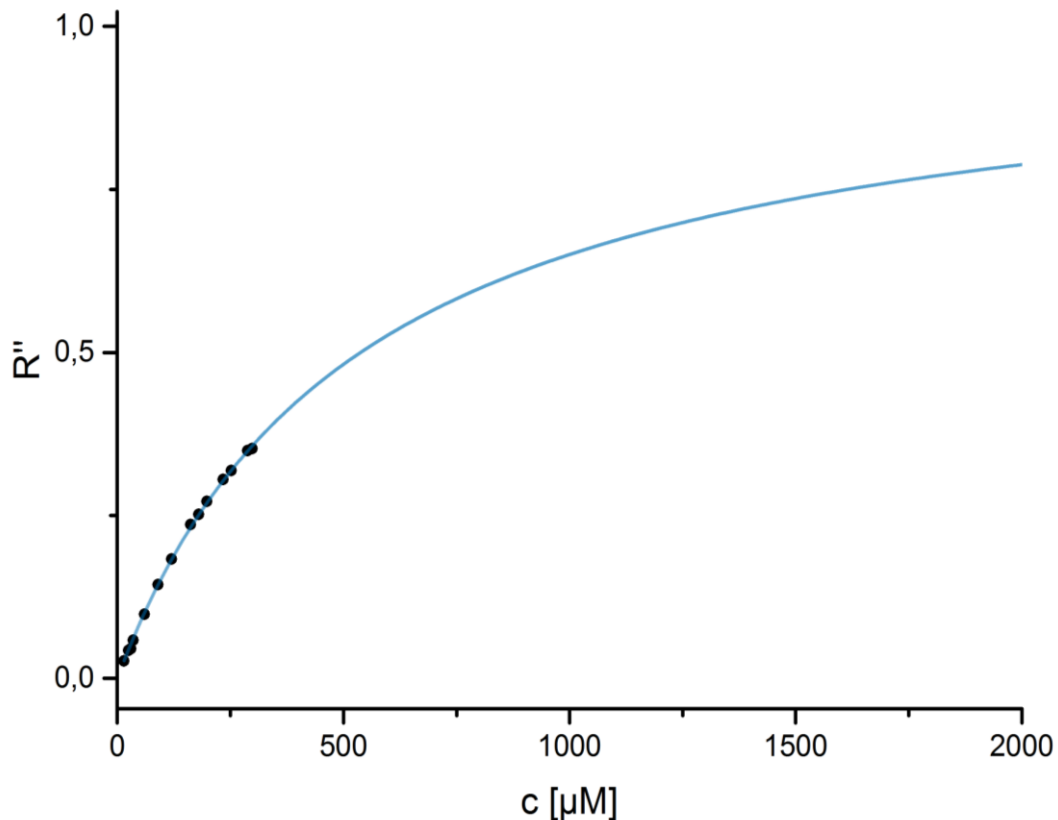


**Abbildung 38:** Regressionsgerade zur Bestimmung der Ligandenbindungsplätze auf dem Säulenmaterial. Auf der x-Achse ist der reziproke Wert der Stoffmenge zum Durchbruchzeitpunkt aufgetragen, auf der y-Achse ist der reziproke Wert der jeweils dazugehörigen Analytkonzentration aufgetragen.

Durch einen nicht-linearen Fit (nach Formel 9) des Quotienten aus  $m_{\text{Lapp}(i)}$  und  $m_L$  ( $R''$ ) gegen die jeweilige Analyt-Konzentration  $c_i$  ergibt sich die in Abbildung 39 gezeigte Bindungshyperbole.

$$R'' = \frac{c}{K_D + c}$$

**Formel 9:** Berechnung des Response-Wertes  $R''$  wobei  $c$  für die Konzentration und  $K_D$  für die Dissoziationskonstante steht.



**Abbildung 39:** Abgebildet ist die Bindungshyperbole. Auf der x-Achse ist  $R''$  gegen die Analytenkonzentration auf der y-Achse aufgetragen

Der Literaturwert für den  $K_D$  (HSA/Carbamazepin) liegt bei  $90,9 \mu\text{M}$  bei  $25^\circ\text{C}$  [93] gemessen mit FAC. Der mit den Chromolith® Säulen im Rahmen des Wahlpflichtfaches ermittelte Wert beträgt  $538,2 \pm 5,82 \mu\text{M}$  bei  $25^\circ\text{C}$ . Wobei im Nachhinein betrachtet die Abweichung als eher unrealistisch betrachtet wird.

Bei der Untersuchung des Literaturwertes der Forschungsgruppe um Hage und des eigenen ermittelten Wertes fällt der Unterschied der Dissoziationskonstante um eine Größenordnung auf. Dieser Unterschied kann mehrere Ursachen haben.

Als erstes wäre der Umstand zu erwähnen, dass die eigene Arbeit noch nicht durch mehrere Wiederholungsversuche bestätigt werden konnte, da sie hauptsächlich im Rahmen eines Wahlpflichtfaches unter der Mitwirkung von drei Studierenden erfolgte. Des Weiteren beziehen die Berechnungen auch Experimente mit ein, die den Charakter von Vorarbeiten haben, da sie auf völlig neuem Terrain erarbeitet wurden. Allerdings sind Folgearbeiten zur Validierung und Überprüfung im Gange.

Als zweites wäre der generelle Unsicherheitsfaktor von Bindungsdaten zu nennen [38]. Zwar werden hier Bindungsdaten verglichen, die mit der gleichen Methode gewonnen wurden, allerdings hat man viele Unsicherheitsfaktoren dabei, die nicht kontrolliert werden können/konnten. Die Arbeitsgruppe Hage hat laut Veröffentlichung ein komplett anderes Equipment benutzt und vorallem das HSA hat eine relativ große Variationsmöglichkeit, da es ein Naturprodukt ist. In der Veröffentlichung [38] ist eine große Liste gegeben in der alle

Faktoren benannt und korreliert werden, die bei der Bestimmung von Bindungsdaten Unterschiede herbeiführen können.

## 6. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Teile. Im ersten wird die Notwendigkeit und Ermöglichung einer Gerätequalifizierung für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie im Speziellen und für Ligandenbindungsassays im Allgemeinen erörtert. Eine Methode zur Leistungsqualifizierung wurde erarbeitet. Die unterschiedlichen Richtlinien und Vorgaben verschiedener Gremien für Validierung und Qualifizierung werden kurz vorgestellt, sowie die große Familie der Ligandenbindungsassays. Weiterhin werden die Probleme der Datenqualität bei der SPR-Analytik diskutiert und die Dissoziationskonstante als besonders wichtiger Parameter der Arzneimittelentwicklung für Struktur-Wirkungsbeziehungen und Arzneimittel-Zielstrukturinteraktion präsentiert.

Zweitens wird die Analytische Affinitätschromatographie vorgestellt und Immobilisierungsprotokolle überprüft und Bindungsmessungen auf Silica-Monolithen durchgeführt.

### 6.1. Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Für das Biacore X100 Gerät mit der SPR-Technologie wurde eine umfassende Liste an Leistungsparametern für kinetische Methoden erarbeitet. Dazu wurde eine gängige Methode [75] benutzt, mit dem Antigen-Antikörpersystem vom  $\beta 2$  Microglobulin. Es konnte gezeigt werden, dass dieses System sehr gut für Langzeitmessungen geeignet ist, welche zur Leistungsqualifizierung herangezogen werden können. Die problemlose Verfügbarkeit der Substanzen am Markt, die einfache Handhabung und Lagerung und der Messbereich der kinetischen Konstanten dieses Antigen-Antikörpermesssystems bildeten eine gute Voraussetzung für die Durchführbarkeit dieser Arbeit.

Die untersuchten Parameter sind die  $K_D$ ,  $k_d$ ,  $k_a$ ,  $R_{max}$ ,  $k_t$ ,  $\chi^2$ , die Summe der Beträge der Residuen und RI [41]. Als besonders wichtige Indikatoren zeigten sich die beiden Ratenkonstanten, der  $R_{max}$  und der  $\chi^2$ . Die  $k_d$  hat sich als der Parameter präsentiert, welcher sehr unabhängig von äußeren Einflüssen ist und damit ein konstanter Wert ist, mit im schlechtesten Fall maximal 5 % RSD %. An der  $k_a$  hingegen konnten viele der äußeren Einflüsse abgelesen werden (RSD % von 4-31 %). Als hauptsächliche äußere Einflüsse müssen die Verdünnungsreihe, das Training der Bediener/Anwender, sowie die benutzten Materialien berücksichtigt werden. Der  $\chi^2$  als *Goodness of Fit* Parameter wird bei Antigen-Antikörpermesssystemen bis zu einem Wert von  $\leq 10$  akzeptiert, in der vorliegenden Arbeit hat er nie den Wert 3,07 überschritten. Die  $K_D$  als allgemein wichtigster Parameter für die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Ligandenbindungsassays [38] zeigte, dass eine RSD % von 3-6 % in Langzeitmessungen von über 60 Messungen möglich sind.

In dieser Arbeit wurden die Sensorchips von zwei Herstellern mit vergleichbarer Oberfläche benutzt und die Ergebnisse zeigten sowohl einige Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten. Für beide Sorten konnten eindeutige Alterungseffekte an der Oberfläche mit dem gebundenen Liganden gezeigt werden. Hier offenbarte der  $R_{max}$  seine Leistungsfähigkeit diese Effekte verfolgen und dokumentieren zu können. Es stellte sich heraus, dass für die Lebenszeit des Chips die tatsächliche Zeit der Nutzung und Lagerung wichtiger ist als die Anzahl an Regenerationsschritten die durchgeführt wurden. Der  $R_{max}$  kann bei dieser Methode bis auf



die Hälfte seines Anfangswertes sinken, ohne dass die kinetischen Ratenkonstanten davon beeinflusst werden.

Als größere Einflussquelle von Fehlern zeigte sich bei dieser Arbeit die Verdünnungsreihe. Am Anfang wurde mit einer klassischen Verdünnungsreihe gearbeitet, die dann auf eine Verdünnungsmethode umgestellt wurde, bei der jede Konzentration aus der Ursprungskonzentration hergestellt wurde um den systematischen Fehler zu reduzieren. Weiterhin zeigte sich, dass die Qualität der Verdünnungsreihe auch stark mit der Erfahrung des Anwenders zusammenhängt.

Als bewährtes Mittel für die Verbesserung von Datenqualität wurde eine Standardarbeitsanweisung aus den Langzeitmessungen erarbeitet [82]. Darin werden der Immobilisierungsprozess, die Verdünnungsreihe, die Messreihen, die Auswertung und die Reinigung und Instandhaltung beschrieben.

Es gibt grundsätzlich zwei Messarten für kinetische Messungen am Biacore X100, die MCK- und SCK-Messungen. Bei der Untersuchung der beiden Methoden zeigten beide jeweils Vor- und Nachteile für eine Leistungsqualifizierungsmethode. Die SCK-Methode erbrachte deutlich schneller Ergebnisse (mit der SCK-Methode hat man ein Ergebnis innerhalb von drei Stunden, bei der MCK-Methode innerhalb von vier Stunden), mit der MCK-Methode hingegen zeigten sich nicht so viele Ausreißer wie mit der SCK.

Kontrollkarten wurden in dieser Arbeit als ein grundsätzlich wichtiges und unentbehrliches Instrument in der SPR-Analytik bekräftigt. Das Darstellen der Werte der jeweiligen Parameter im Zusammenhang mit äußeren Einflüssen oder Standardabweichungen ermöglicht häufig erst die Korrelation von bestimmten Faktoren. Jeder Anwendungsfehler oder jede leichte Variationen durch Pufferveränderungen werden in den Kontrollkarten sichtbar. Allerdings darf über den Kontrollkarten nicht die wichtige Auswertung der eigentlichen Kurven und ihrem Verlauf verloren gehen. Wenn die Form der Bindungskurve keinen Sinn ergibt, dann kann auch deren Auswertung nicht zu sinnvollen Ergebnissen führen.

Durch diese Arbeit werden Referenzdaten sowie eine Standardarbeitsanweisung bereitgestellt, die zukünftig die Möglichkeit der Leistungsqualifizierung von SPR-Geräten verbessern soll.

## **6.2. Hochleistungsaffinitätschromatographie**

Die analytische Hochleistungsaffinitätschromatographie ist ein noch recht kleines Gebiet unter den Ligandenbindungsassays.

In dieser Arbeit wurden zwei Ansätze verfolgt. Als Erstes wurden zwei Immobilisierungsprotokolle von HSA auf den industriell gefertigten 5mm langen Silica-Monolithsäulen und deren Überprüfung untersucht und als Zweites wurde die Messung von Bindungskonstanten zwischen HSA und Carbamazepin mit den Säulen durchgeführt. Die Länge der Säulen wurde so kurz gewählt um den Verbrauch an Liganden und Analyten möglichst gering zu halten.

Es wurden zwei Immobilisierungsprotokolle getestet, wobei sich herausstellte, dass das Zweite eine deutlich höhere Beladung der Säule mit HSA ermöglichte. Die Ergebnisse, die mit dieser Säule in der anschließenden Trennung von D- und L-Tryptophan erreicht wurden,

zeigten eine deutliche Verbesserung der Peakform und eine Basislinientrennung der beiden Enantiomere.

Für die Bestimmung der Bindungskonstanten von HSA und Carbamazepin wurden viele Konzentrationen der Carbamazepinlösung mit einer speziellen Methode an einer HPLC vermessen. Die *Frontal Affinity Chromatography* hat als Besonderheit die kontinuierliche Applikation des Analyten über den Puffer, um eine Sättigung des Liganden auf der Säule und damit eine Durchbruchkurve zu erhalten. Aus diesen Durchbruchkurven wurde eine Dissoziationskonstante berechnet. Der ermittelte  $K_D$  Wert von  $538 \pm 5,82 \mu\text{M}$  bei  $25^\circ\text{C}$  unterscheidet sich um eine Potenz von dem Literaturwert,  $90,9 \mu\text{M}$  bei  $25^\circ\text{C}$ , der für Carbamazepin mit der Methode ermittelt wurde [93]. Dieser Unterschied kann verschiedene Gründe haben, erstens müssen die Ergebnisse durch Wiederholungsexperimente noch weiter bestätigt werden und zweitens sind solche Abweichungen in der Größenordnung bei biologischen Messsystemen noch weithin akzeptiert aufgrund der hohen Variabilität durch Geräte und Substanzen.

### 6.3. Zusammenführung

Die beiden Ligandenbindungsassays, die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie und die Hochleistungsaffinitätschromatographie, unterscheiden sich nicht nur in ihrer analytischen Technik, sondern sind auch bezogen auf den Entwicklungsstand des jeweiligen Messverfahrens sehr unterschiedlich. Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie wird mit vielen Geräten und Methoden angeboten und angewendet, wohingegen die analytische Affinitätschromatographie noch in den Kinderschuhen steckt.

Allerdings hat auch die SPR-Spektroskopie in manchen Punkten noch „Kinderkrankheiten“, was in den Veröffentlichungen von Myszka et al. sehen kann [47–58]. Die Qualität der veröffentlichten Daten ist, wie darin gezeigt, häufig nicht nachvollziehbar oder schlicht schlecht aufgrund von fehlendem Verständnis für die Erlangung von guter Datenqualität. Häufig fehlt eine grundsätzliche Qualifizierung der Geräte, Nachweise über die Reproduzierbarkeit der ermittelten Daten oder bei der Auswertung wird die Sinnhaftigkeit der Kurven nicht mit in Betracht gezogen. Um in Zukunft die Leistungsqualifizierung für SPR-Geräte für die Nutzer zu erleichtern, wurde eine deutliche und strukturierte SOP entwickelt. Dieser liegt eine bereits etablierte Methode zugrunde, mit leicht zugänglichen Materialien, welche auf möglichst viele Geräte übertragbar ist und bei welcher kinetische Bindungsdaten in einem gut zugänglichen Größenbereich ( $K_D \approx 2 \times 10^{-9}$  bis  $1 \times 10^{-10}$  M) aufgenommen werden. Diese SOP beruht auf zugänglichen Daten die erläutern, wie auf die jeweiligen Schritte geschlossen wurde, damit mögliche Missverständnisse ausgeschlossen werden können.

Die AAC ist noch eine noch weiter zu entwickelnde Methode und stellt sich dementsprechend noch ganz anders dar als die SPR-Spektroskopie. Der Ansatz in dieser Arbeit war, die Übertragbarkeit der Ergebnisse aus der Literatur von selbst hergestellten Monolithen auf industriell gefertigte Monolithen zu überprüfen. Dafür mussten gewisse Vorarbeiten wie die Immobilisierung des Liganden und danach auch die Überprüfungen der Beladung und Aktivität/Intaktheit des Liganden auf der Säule durchgeführt werden. Diese Arbeiten zeigen,

dass die Protokolle aus den Veröffentlichungen [91, 93, 94] übertragbar waren und Bindungskonstanten bestimmt werden konnten.

#### **6.4. Ausblick**

Die Leistungsqualifizierungsmethode, die hier erarbeitet wurde, soll anderen Nutzern von SPR-Spektroskopiegeräten zur Qualifizierung ihrer Geräte dienen. Die Leistungsqualifizierung kann einen Einfluss auf die Verbesserung ihrer Daten haben. Sie kann auch für Geräte, die im Qualitätssicherungsbereich eingesetzt werden, benutzt werden.

Die AAC Arbeiten sind Vorarbeiten zu weiteren Untersuchungen von Bindungskonstanten mit kleinen Monolithen. Das Ziel ist es, das Antigen-Antikörpersystem, welches ausführlich mit der SPR-Spektroskopie in dieser Arbeit analysiert wurde, auf die AAC zu übertragen, um einen genauen Vergleich der beiden Ligandenbindungsassays zu haben.

## 7. Methoden und Materialien

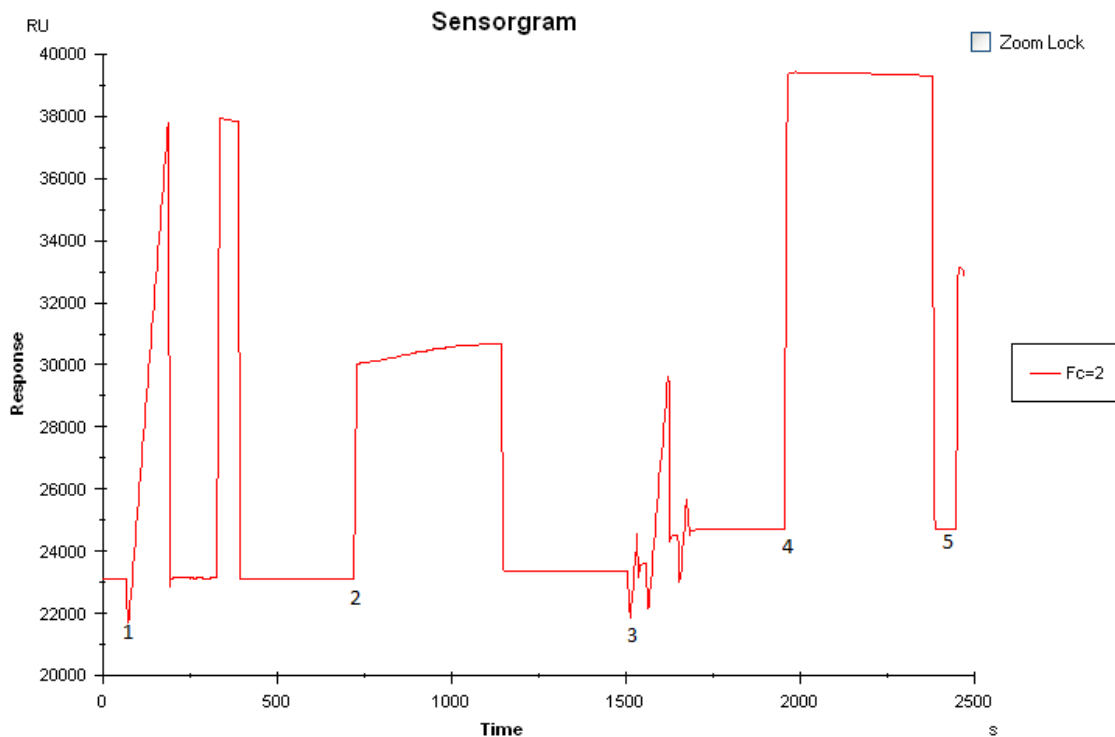
### 7.1. Methoden und Materialien für SPR-Experimente

#### 7.1.1. Materialien

Die Experimente wurden auf einem Biacore™ X100 von GE Healthcare (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die produzierten Daten wurden mithilfe der Biacore Evaluation Software 2.0 und einer globalen 1:1 Passung (fit) bearbeitet. Weitere Bearbeitungen und Darstellungen wurden mithilfe von Microsoft Excel 2007/2016 und Origin Pro 2016 gemacht. Der murine Antikörper Anti-  $\beta$ 2 Microglobulin (Klon B2M-02 mit 150 kDa) und das  $\beta$ 2 Microglobulin aus menschlichem Urin waren von Sigma-Aldrich. Die CM5 Sensorchips, das Amin-Kopplungskit, welches 0,1 M *N*-Hydroxysuccinimid (NHS), 0,4 M 1-ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC), 1,0 M Ethanolamin-HCl (pH-Wert 8,5) enthält, der Kopplungspuffer aus 10 mM Natriumacetat Lösung pH 5,0 und die Instandhaltungs- und Reinigungschemikalien (BIAAdesorb Lösung 1 mit 0,5 % w/v Natriumdodecylsulfat, BIAAdesorb Lösung 2 mit 50 mM Glycin-NaOH pH 9,5, BIADisinfectant Lösung aus Natriumhypochlorit (konz.) mit 8 -15 % aktivem Chlor, BIAtest Lösung mit 15 % Saccharose (w/w) in HBS-EP Puffer) wurden von GE Healthcare bezogen. Die CMD 500 L Sensorchips wurden bei der Firma Xantec eingekauft. Die Regenerationslösung aus 10 mM Glycin-HCl Lösung pH 2,5 und der Laufpuffer HBS-EP+ mit pH 7,4 (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) 10 mM, Natriumchlorid 150 mM, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 3 mM, Polysorbat 20 0,05 % (v/v)) wurden vor Ort mit hochgereinigtem Reinstwasser hergestellt und durch einen 0,2  $\mu$ m Nylonfilter filtriert. Die Substanzen wurden alle bei Carl Roth eingekauft. Der Laufpuffer wurde im Biacore X100 entgast.

### 7.1.2. Immobilisierung

Das Immobilisierungsprotokoll wurde vollständig aus der Anleitung vom Biacore™ X100 *Getting Started Kit* für kinetische Messungen übernommen [75].



**Abbildung 40:** Sensorgramm aufgenommen während der Immobilisierung, mit Anti-B2M Antikörper, der Flusszelle Nr.2. Bei Punkt 1 wird die Kapazität der Oberfläche mit einer Probeinjektion des Antikörpers überprüft. Punkt 2 zeigt die Aktivierung der Carboxylgruppen mit einem EDC/NHS-Gemisch. Punkt 3 illustriert die schrittweise erfolgende Applikation des Antikörpers auf die nun aktivierte Oberfläche. Punkt 4 zeigt die Applikation des Ethanolamins. Punkt 5 zeigt das endgültige Immobilisierungslevel.

Der Antikörper wurde kovalent durch Amin-Kopplung an die Chipoberflächen gebunden bei konstanten 25 °C im Instrument. Der Antikörper wird einem 10 mM Natriumacetat Puffer mit pH 5,0 auf eine Konzentration von etwa 30 ng/μL verdünnt. Dabei muss ein Verhältnis von mindestens 9 Teilen Puffer und 1 Teil Antikörperlösung herrschen, damit der richtige pH-Wert für die Kopplung gegeben ist. Die Oberfläche des Chips wird dann mit einer frisch im Gerät gemischten Mischung aus NHS und EDC im Verhältnis 1:1 aktiviert. Diese Phase (Nr. 2 in der Abb. 40) dauert etwa 10 Minuten und die Mischung wird mit einem Fluss von 7 μL pro Minute über die Oberfläche gegeben. Dabei werden die Carbonsäuren an den Dextranketten mit dem EDC aktiviert und mit dem NHS bilden sich sogenannte NHS-Ester, welche dann im nächsten Schritt relativ gut mit Aminen vom Antikörper reagieren und kovalente Carbonsäureamid-Bindungen übriglassen. Der Antikörper wird in Pulsen über die aktivierte Oberfläche gegeben, bis das gewünschte Immobilisierungslevel von 1200 RU erreicht ist (Nr. 3 in Abb. 40). Darauf folgt die Lösung mit Ethanolamin-HCl pH 8,5 für acht Minuten bei einem Fluss von 8 μL pro Minute zum Blockieren der übrigen noch aktivierten NHS-Ester auf der Oberfläche (Nr. 4 in

Abb. 40). Das Immobilisieren ist erfolgreich, wenn die Basislinie nach dem Immobilisieren ca. 1200 RU höher ist als vorher.

### 7.1.3. Puffer

Der empfohlene Laufpuffer ist der HBS-EP+. Dieser wurde im Labor unter Verwendung von Chemikalien mit analytischem Grad hergestellt.

Der HBS-EP+ Puffer besteht aus 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA und 0,05 % Polysorbat 20. Im Labor wurde für das Polysorbat 20 eine 0,5 %ige Stammlösung hergestellt, da das Polysorbat 20 sehr zähflüssig ist und sich kleine Mengen mit Eppendorf-Pipetten nur schlecht pipettieren ließen. Für die Gleichmäßigkeit des Puffers wurde immer eine Vorratslösung des Puffers hergestellt. Diese war eine zehnfach konzentrierte Lösung aus der dann jeweils zehnmal Puffer verdünnt werden konnte mit immer frischem hochgereinigtem Reinstwasser (Sartorius Arium). An das Biacore X100 lassen sich nur Flaschen mit einem Volumen von 500 mL anschließen. Der Puffer wurde jedes Mal auf einen pH-Wert von 7,4 mit 0,1 M NaOH am pH-Meter eingestellt. Nach der Einstellung wurde der Puffer durch einen 0,22 µm Nylonfilter mithilfe einer Wasserstrahlpumpe filtriert.

Am Anfang der Messungen wurde der HBS-EP Puffer benutzt, welcher statt 0,05 % nur 0,005 % Polysorbat 20 enthält. Während der Messung der SCK1 Reihe wurde der Puffer umgestellt.

### 7.1.4. Verdünnungsreihen

Im *Getting Started Kit* für das Biacore X100 wird eine klassische Verdünnungsreihe vorgegeben. In dieser wird aus dem Antigen-Aliquot eine 128 nM Lösung hergestellt, durch eine Verdünnung von 9 µL Antigen-Aliquot mit 591 µL Puffer, aus welcher dann mittels einer 1+3 Verdünnung die 32 nM Lösung verdünnt wird. Aus der 32 nM Lösung wird durch eine 1+1 Verdünnung die 16 nM Lösung hergestellt. Aus der 16 nM Lösung wird wieder durch eine 1+1 Verdünnung die 8 nM Lösung hergestellt. So wird verfahren bis zur Konzentration von 2 nM.

Nach der SCK1 Messreihe wurde das Pipettierschema von der Reihenverdünnung hin zu einem neuen Schema verändert. In dem neuen Schema wird wie im alten aus dem Antigen Aliquot eine 128 nM Lösung hergestellt, aus welcher alle folgenden Konzentrationen hergestellt wurden. Die 32 nM Lösung wurde wie im alten Protokoll hergestellt, die 16 nM Lösung wurde dann durch eine 1+7 Verdünnung aus der 128 nM Lösung gewonnen (s. Tabelle 5).

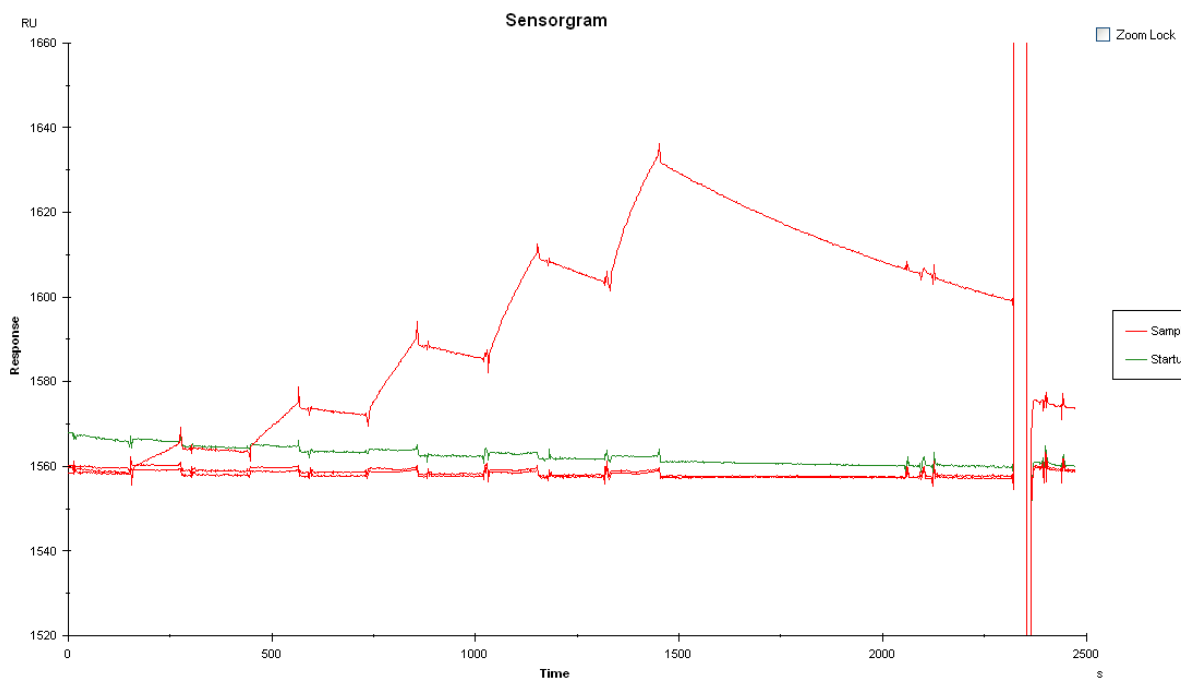
Konzentration [nM]	Altes Verdünnungsprotokoll		Neues Verdünnungsprotokoll	
	µL [Lösung]	µL [Puffer]	µL [Lösung]	µL [Puffer]
128	9 [Aliquot]	591	9 [Aliquot]	591
32	300 [128 nM]	900	240 [128 nM]	720
16	600 [32 nM]	600	120 [128 nM]	840
8	600 [16 nM]	600	60 [128 nM]	900
4	600 [8 nM]	600	30 [128 nM]	930
2	600 [4 nM]	600	15 [128 nM]	945

Tabelle 5: Gegenüberstellung der zu pipettierenden Menge für jede Konzentration des alten und neuen Verdünnungsprotokolls.

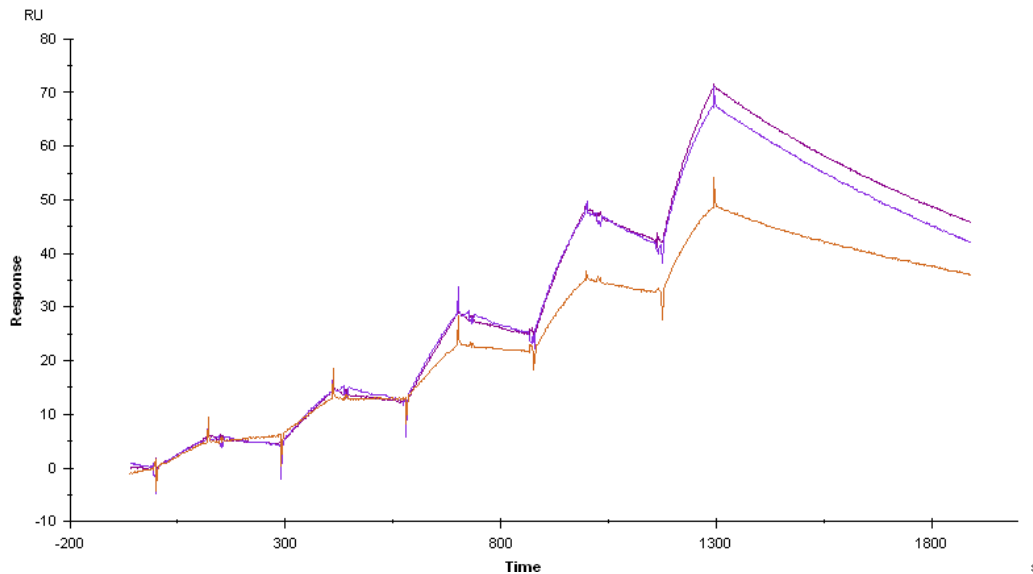
## 7.1.5. Messreihen

### 7.1.5.1. SCK1

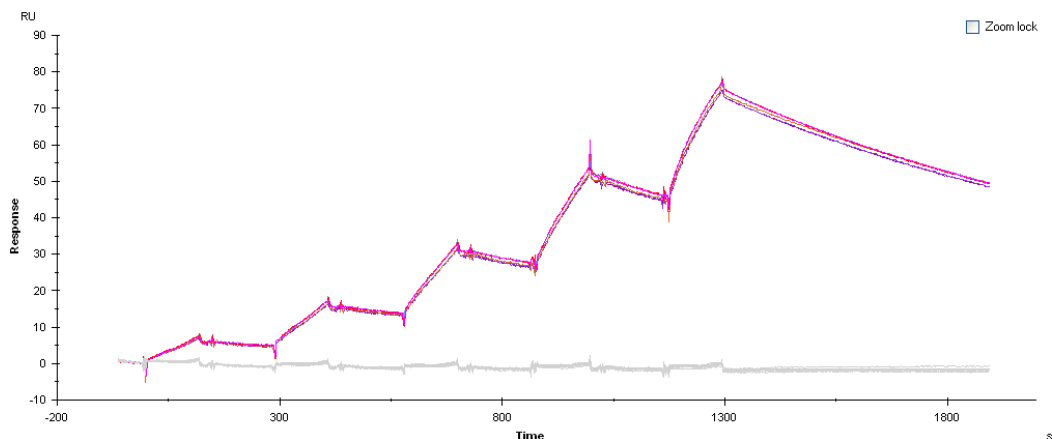
Die Messreihe der SCK1 lief über neun Wochen und erbrachte 98 kinetische Datensätze. Nach der Immobilisierung wurde eine Analytenbindungskapazitätsmessung gemacht, bei der für drei verschiedenen Konzentrationen jeweils das *Response* Maximum ermittelt wurde. Bei der Konzentration von 256 nM lag es bei 128,2 RU, bei 128 nM bei 95,4 RU und bei 64 nM bei 86,3 RU. Am Ende der Messungen wurde diese Kapazitätsmessung wiederholt, mit dem Ergebnis, dass die Werte auf 72,3/53,8/48,2 RU um etwa die Hälfte gesunken waren.



**Abbildung 41: Rohdaten-Sensorgramm des Laufes 20140612 2.** In grün ist der *Start up*-Lauf zu sehen, die roten Läufe sind zweimal der Blind-Lauf und einmal der Analytenlauf mit dem klassischen Sägezahnmuster für die Auftitrierung. Der große Ausschlag am Ende ist der Regenerationsschritt, wobei danach die unvollständige Basislinienrückkehr des Analytenlauf zu erkennen ist. Diese ist auch der Grund dafür, dass der grüne *Start up*-Lauf etwas höher startet, er bildet die Rückstände aus dem Messlauf zuvor ab.



**Abbildung 42:** Sensorgramme der Läufe 20140606 1, 20140704 2 und 20140805 3. Die Blind-Läufe wurden noch nicht berücksichtigt. Diese drei Läufe sind vom Anfang aus der Mitte und vom Ende der SCK1-Messreihe und wurden übereinander gelegt um zu zeigen, dass sich die Kurven zwar in der Höhe verändern, die Form aber vergleichbar bleibt.



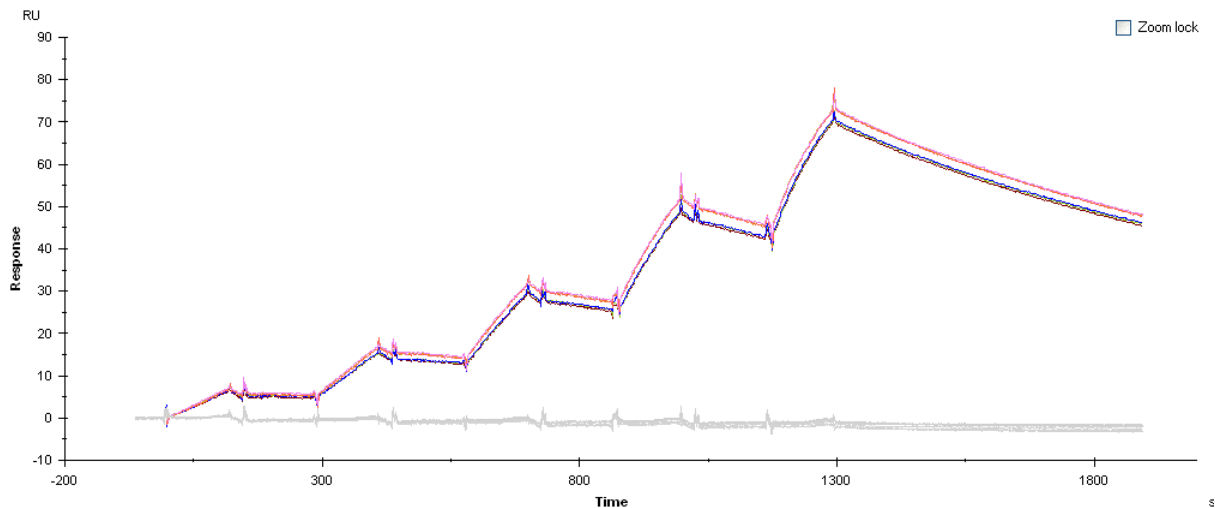
**Abbildung 43:** Die Sensorgramme von sechs aufeinander folgenden Messläufen (20140610 1 bis 20140611 3) sind dargestellt um die Reproduzierbarkeit der Kurvenformen zu verdeutlichen.

Die Messung besteht aus einem *Start up*-Lauf, gefolgt von zwei Blindläufen und einem Analytenlauf in dem jeweils für 30 Sekunden nacheinander die Konzentrationen 2, 4, 8, 16 und 32 nM auftitriert werden. Nach jeder Assoziationsphase folgt eine 30 sekündige Dissoziationsphase, nur nach der letzten und höchsten Konzentration dauert diese Phase 600 Sekunden. Am Ende jedes Laufes findet eine 30 Sekunden andauernde Regeneration statt.



### 7.1.5.2. SCK2

Die SCK2-Messreihe lief über etwa 13 Wochen mit vierwöchiger Pause bedingt durch Reparaturen des Gerätes und weiterer drei Wochen Weihnachtspause. Die Messungen ergaben 89 auswertbare kinetische Datensätze. Die anfängliche Bestimmung der maximalen Analytenbindungskapazität erbrachte für 256 nM 124 RU, für 128 nM 82,2 RU und für 64 nM 73,3 RU. In der Mitte der Messungen wurde die Bindungskapazität erneut überprüft, und ergab jeweils 96,4 RU, 93,7 RU und 89,8 RU. Eine Überprüfung am Ende war nicht möglich.



**Abbildung 44:** Sechs Sensorgramme der Läufe 20141027 1 bis 20141028 3 übereinander gelegt, ohne Berücksichtigung der Blind-Läufe, die hier in grau dargestellt sind.

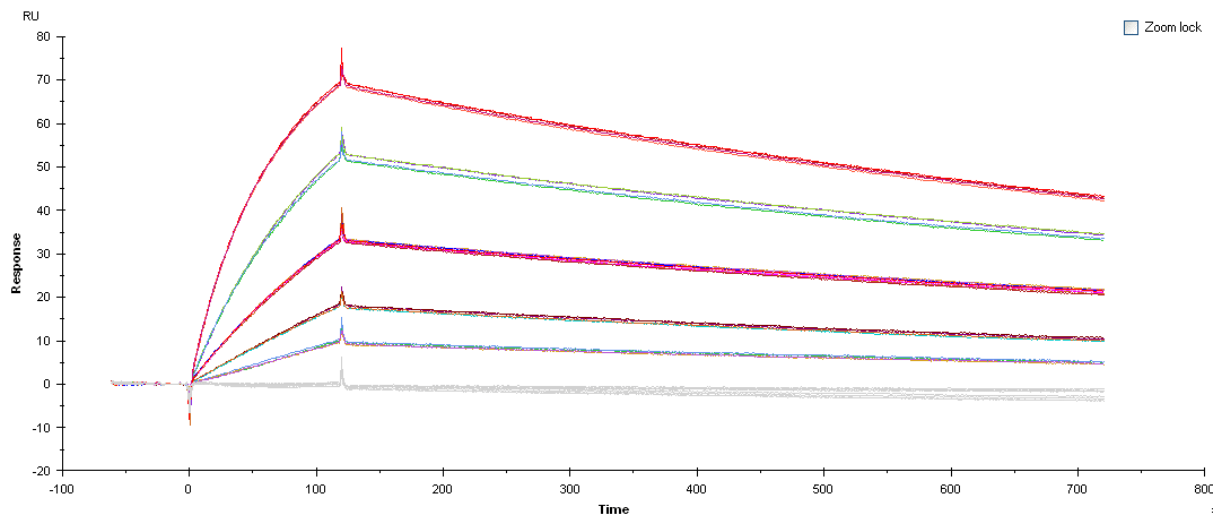


Abbildung 45: Die gleichen sechs Läufe wie in Abbildung 44, jetzt mit Berücksichtigung der Blind-Läufe und Referenzflusszelle. Sie sind gefittet und die aus der Kombination der Läufe ermittelten Werte werden im Auswertungsfenster dargestellt.

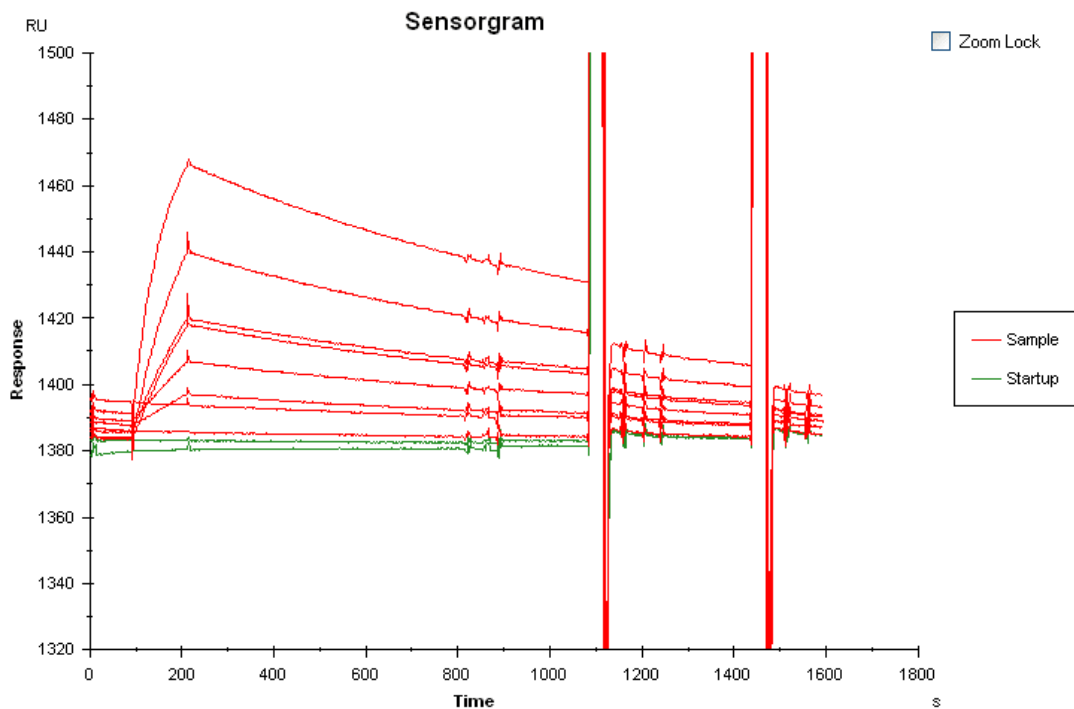
### 7.1.5.3. MCK1

Die Messungen der MCK1-Messreihe dauerten ca. 10 Wochen und ergaben 74 auswertbare kinetische Datensätze. Die Überprüfung der maximalen Bindungskapazität ergab am Anfang

für 256 nM 132,3 RU, für 128 nM 107,6 RU und für 64 nM 99,0 RU. Am Ende blieben noch 83,5 RU, 74,2 RU und 69,3 RU in der Überprüfung übrig.



**Abbildung 46: Sensorgramm von sechs aufeinander folgenden MCK-Messungen (20150323 1 bis 20150325 2). In grau sind die Blind-Läufe abgebildet.**



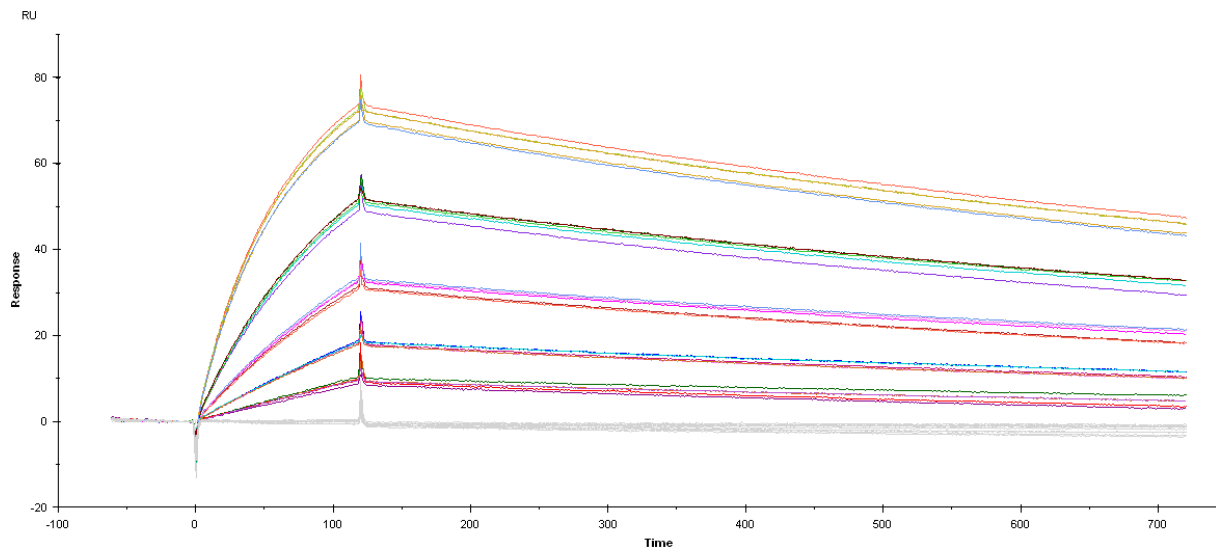
**Abbildung 47: Zoom in das Rohdatensensorgramm der MCK-Messung 20150220 1.**

In der MCK1-Messreihe sollte der Aufbau möglichst vergleichbar mit dem der SCK-Messungen werden. Um das zu realisieren wurden vorher mit einem anderen Chip verschiedene Strategien ausgetestet. Am wirkungsvollsten erwies sich die Messreihenfolge von zwei *Startup* Läufen, gefolgt von einem Blindlauf, darauf die Analytenläufe (in der Reihenfolge 8, 4, 2, 16, 32 nM), danach wieder ein Blindlauf, gefolgt von einem Analytenreferenzlauf mit der

Konzentration 8 nM. Alle Läufe wurden aufgrund der mangelhaften Basislinienrückkehr mit nur einem Regenerationsschritt, mit zwei Regenerationsschritten von je 30 Sekunden durchgeführt.

#### 7.1.5.4. MCK2

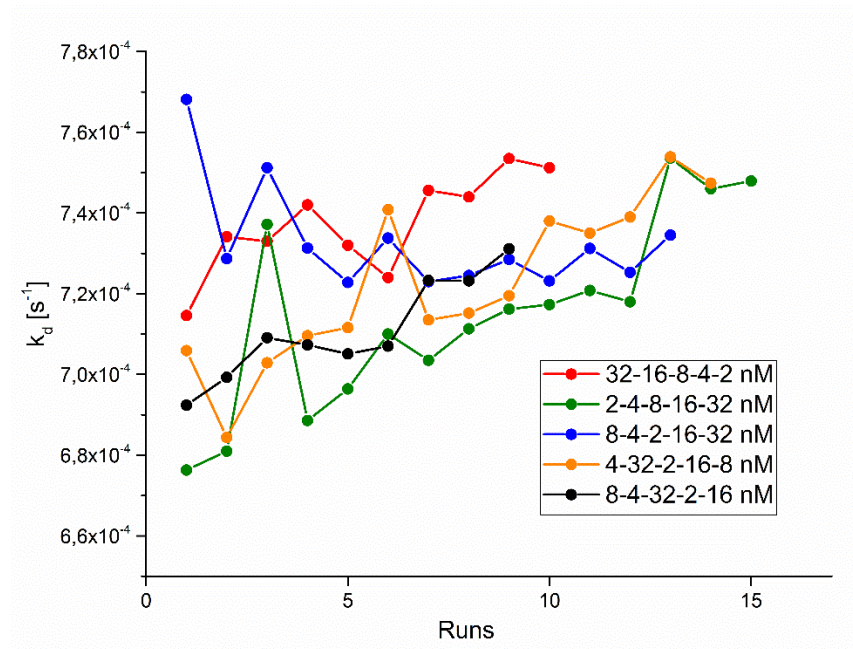
Die Messreihe MCK2 dauerte ca. 11 Wochen mit dreiwöchiger Pause wegen einer Reparatur des Gerätes und ergab 61 kinetische Datensätze. Die Überprüfung der maximalen Bindungskapazität ergab am Anfang für 256 nM 136,1 RU, für 128 nM 114,8 RU und für 64 nM 106,5 RU. Am Ende konnte keine Überprüfung durchgeführt werden.



**Abbildung 48: Überlagerung der fünf verschiedenen Sequenzen der MCK2 (20150610 1 bis 3 und 20150611 1 und 3). Im Vergleich mit der Abbildung 46 wird der Einfluss der Randomisierung deutlich. Die Kurven zeigen in allen Konzentrationen eine höhere Abweichung zwischen den randomisierten Läufen.**

Die MCK2 wurde neu strukturiert um einen realistischeren Ansatz als die MCK1-Messreihe zu haben. In der Regel wird in der Fachliteratur dazu geraten eine randomisierte Reihenfolge der Analytenkonzentrationen zu vermessen [76]. Dadurch soll der Einfluss von systematischen Fehlern verringert werden. Sequenz Nummer 1 fängt mit der höchsten Konzentration an und darauf folgen dann die jeweils immer niedrigeren Konzentrationen. Sequenz Nummer 2 fängt mit der niedrigsten Konzentration an und darauf folgt immer jeweils die nächst höhere Konzentration. Sequenz Nummer 3 hat die gleiche Reihenfolge wie die Messreihe MCK1. In

Sequenz Nummer 4 wechseln sich hohe und niedrige Konzentrationen jeweils ab. Sequenz Nummer 5 ist eine randomisiert zusammengestellte Reihe (s. Abb. 49).



**Abbildung 49:** Alle Messungen wurden jeweils nach ihrer Sequenz und dem Zeitpunkt wann sie stattgefunden haben sortiert und die Dissoziationsratenkonstante gegen die Anzahl der Läufe aufgetragen.

Die MCK2 machte sichtbar, was auch schon in den anderen Messreihen vermutet wurde, dass der  $k_d$ -Wert über die Nutzungszeit eines Chips ansteigt, unabhängig von der Reihenfolge der Analytenkonzentrationen (Abb. 49).

#### 7.1.5.5. SCK Xantec 1

Die Messreihe SCK Xantec 1 war eine Wiederholung der SCK-Messungen auf den Biacore™ Chips. Die Bindungskapazitätsüberprüfung erbrachte für 256 nM 151,0 RU, für 128 nM 130,5 RU und für 64 nM 120,7 RU. Die Kapazität war sichtlich erhöht gegenüber den Biacore Chips. Die Messungen liefen über einen Zeitraum von acht Wochen mit einer kurzen Unterbrechung für Messungen aus einem anderen Projekt. In diesem kurzen Zeitraum wurde der Chip in Argon Atmosphäre im Kühlschrank gelagert. Einige Messungen wurden von einem anderen Bediener durchgeführt (vgl. Kap. 4.12 und Abb. 25).

#### 7.1.5.6. SCK Xantec 2

Die SCK Xantec 2-Reihe wurde zur Überprüfung der Ergebnisse aus der SCK Xantec 1-Reihe durchgeführt. Die Messreihe dauerte drei Wochen und ergab 32 Datensätze.

#### 7.1.6. Regeneration

Die Regenerationslösung ist eine Lösung aus 10 mM Glycin-HCl mit einem pH-Wert von 2,5. Das Glycin wurde in Reinstwasser gelöst und mit einer 0,1 M Salzsäurelösung auf einen pH-

Wert von 2,5 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung durch einen 0,22 µm Nylonfilter filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt.

### 7.1.7. Sensorchips



**Abbildung 50: Biacore CM5 und Xantec CMD 500 L Chip. Jeweils rechts die dazugehörige Hülle in der der Chip in das Gerät eingeführt wird.**

#### 7.1.7.1. Biacore™ Chips

Biacore Chips wurden einzeln verpackt in Stickstoffatmosphäre geliefert und werden bei Raumtemperatur gelagert. Sobald sie immobilisiert sind, sollten sie in Laufpuffer im Kühlschrank gelagert werden. Die Chips mussten für die Reinigung oder für Reparaturen während der Messzyklen entnommen werden. Sie wurden ohne Außenhülle in einem 50 mL Falconröhrchen mit HBS-EP+ im Kühlschrank gelagert. Beim Wiedereinsetzen in das Gerät wurden die Chips vorsichtig mit Reinstwasser abgespült um Salzreste zu vermeiden und dann vorsichtig mit einem fusselfreien Tuch abgetrocknet. Danach wurden sie wieder in ihre Außenhülle eingeführt und in das Gerät eingesetzt.

Auf der Goldoberfläche sind nach der Immobilisierung deutliche Spuren des Antikörpers zu sehen. Die Goldoberfläche darf während der Reinigung und Abtrocknung nicht berührt werden (vgl. [71]). Zur Reinigung des X100 wurden die *Maintenance* Chips benutzt. Diese bestehen nur aus einer Glasschicht, um von den genutzten Reinigungschemikalien nicht angegriffen zu werden.

#### 7.1.7.2. Xantec Chips

Die CMD 500 L Chips wurden einzeln verpackt in Stickstoffatmosphäre geliefert. Sie sind, so lange sie noch nicht mit Liganden immobilisiert wurden bei -20 °C zu lagern. Auf Grund von vereinzelten Berichten über das Verkleben von Chips mit der optischen Einheit des Gerätes, bei Lagerung in Laufpuffer, wird von der Firma empfohlen einen speziellen relativ zähflüssigen Puffer auf die Gold/Ligandenoberfläche zu tropfen (um den Liganden hydriert zu erhalten)

und den Chip dann in Edelgasatmosphäre im Kühlschrank zu lagern [95].

Da es während der Arbeit keine Möglichkeit gab den speziellen Puffer zu bekommen, der Chip aber außerhalb des Gerätes gelagert werden musste, wurde er in einem 50 mL Falconröhrchen trocken mit Argon bedampft und dann verschlossen im Kühlschrank gelagert. Diese Lagerung hatte einen erwarteten und gewissen Verlust an aktivem Antikörper zur Folge.

### 7.1.8. Instandhaltung und Reinigung

Der Gerätehersteller hat genaue Anweisungen herausgegeben, um das X100 in einem möglichst guten zuverlässigen Zustand zu erhalten [72]. Dazu gehören tägliche Aufgaben, wie das Entleeren der Abfallflasche, wöchentliche und monatliche Aufgaben. Für die Reinigung wird jeweils ein sogenannter *Maintenance* Chip eingelegt, der keine Goldoberfläche, sondern nur eine Glasoberfläche hat. Die Reinigungs- bzw. Wartungsschritte die wöchentlich empfohlen werden sind das *Desorb*, dabei wird jeweils in ein Probengefäß die *BIAdesorb* Lösung 1 (0,5 %ige SDS-Lösung) und die *BIAdesorb* Lösung 2 (50 mM Glycin-NaOH Lösung pH 9,5) gegeben und dann nacheinander injiziert, um die Leitungen, Nadel und Flusszellen zu reinigen. Zusätzlich sollten die Pumpen und die Schläuche regelmäßig auf Lecks untersucht werden. Monatlich (bzw. in regelmäßigen Abständen) sollte eine große Reinigung vorgenommen werden (*Desorb and Sanitize*). Bei diesem Schritt werden nacheinander an den Puffereinlass die *BIAdesorb* 1, *BIAdesorb* 2 und die *BIAdisinfectant* Lösung (verdünnte Natriumhypochloritlösung) angeschlossen. Diese Reinigung entfernt alle im System anhaftenden Proteinrückständen und bzw. oder mögliche entstandene Biofilme. Im Anschluss wird das System mehrere Stunden mit Wasser gespült, um alle Rückstände der Reinigungslösungen zu entfernen. Daran anschließen sollte eine Kalibrierung des Systems. In diesem Schritt werden die Pumpen überprüft, die Ventile, die Injektionen, das Rauschen und der optische Sensor mittels der *BIAtest* Lösung mit 15 % Saccharose.

Des Weiteren wurde eine *Preventive Maintenance* durchgeführt. Bei dieser vorsorglichen Überholung und Überprüfung des Gerätes wurden von einem Firmentechniker Verschleißteile ausgetauscht.

Während der Nutzung des X100 eröffneten sich mehrere Probleme, so dass mehrfach Besuche von Technikern nötig waren. Unter anderem mussten der Drucktank und die optische Platine ausgetauscht werden.

### 7.1.9. Eigens entwickelte Standardarbeitsanweisung für die Leistungsqualifizierung [82]

#### 7.1.9.1. Immobilisierung

Die Immobilisierung folgt dem Biacore X100 *Getting Started* Protokoll [75] für kinetische Messungen mit dem  $\beta 2$  Microglobulin. Der Anti-  $\beta 2$  Microglobulin Antikörper wird kovalent als Ligand an die Chipoberfläche gebunden, wobei das Gerät konstant auf 25 °C temperiert ist. Der Anti-  $\beta 2$  Microglobulin Antikörper wird in einem 10 mM Natriumacetatpuffer mit pH 5 auf eine Konzentration von 30 ng/ $\mu$ L verdünnt. Die Carboxymethyldextranoberfläche des Chips wird mit einer 1:1 Mischung von NHS und EDC für zehn Minuten mit einer Flussrate von

7  $\mu\text{L}/\text{min}$  aktiviert. Die Mischung wird erst direkt im Gerät in einem extra Probengefäß frisch hergestellt. Das Immobilisierungslevel von 1200 RU wird durch eine gepulste Abgabe der Ligandenlösung über die aktivierte Oberfläche erreicht. Danach folgt die Blockierung der übrigen aktivierten Carboxygruppen mithilfe einer Ethanolamin Lösung mit pH 8,5 für 8 Minuten bei 8  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Die Immobilisierung ist erfolgreich, wenn die Basislinie der Messzelle nach der Immobilisierung 1200 RU höher liegt als die der Referenzzelle.

#### **7.1.9.2. Verdünnungsreihe**

Für die Messungen müssen fünf verschiedene Konzentrationen (2, 4, 8, 16 und 32 nM) des Analyten mit dem Laufpuffer hergestellt werden. In dieser Verdünnungsreihe wird jede Konzentration einzeln aus der Stammlösung hergestellt. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 128 nM, dementsprechend müssen 240  $\mu\text{L}$  der Stammlösung und 720  $\mu\text{L}$  vom Laufpuffer genommen werden, die dann eine Konzentration von 32 nM ergeben. Eine Konzentration von 16 nM wird durch die Mischung von 120  $\mu\text{L}$  Stammlösung und 840  $\mu\text{L}$  Laufpuffer erhalten. Für die drei restlichen Konzentrationen wird so fortgefahren. Für drei Messungen am Tag werden 960  $\mu\text{L}$  von jeder Konzentration benötigt.

#### **7.1.9.3. Messläufe**

Für die Messungen wird der MCK-Modus benutzt mit einer festgesetzten Reihenfolge der Analytkonzentrationen. Das Instrument wird konstant auf 25 °C gehalten und die Flussrate beträgt 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Eine MCK-Messungen mit diesem Aufbau besteht aus neun Messläufen, den zwei *Start up*-Läufen, zwei Blindläufen und fünf Analytenläufen, jeweils einer für jede Konzentration. Die *Start up*- und Blindläufe sind reine Pufferläufe und gleich aufgebaut, mit dem einzigen Unterschied, dass die *Start up*-Läufe nur zur Reinigung sind und die Blind-/Referenzläufe mit in die Auswertung mit einbezogen werden. Jeder Lauf besteht aus 120 Sekunden Assoziationszeit und 600 Sekunden Dissoziationszeit und zwei Regenerationsschritten von 30 Sekunden mit einer 10 mM Glycin-HCl-Lösung mit einem pH-Wert von 2,5. Auf die zwei *Start up*-Läufe folgt ein Blindlauf, darauf folgen die fünf Analytenläufe in der Reihenfolge 8-4-2-16-32 nM. Nach den 32 nM folgt ein weiterer Blindlauf. Auf einem Biacore X100 sind drei MCK-Messungen pro Tag oder mindestens zwei möglich.

#### **7.1.9.4. Evaluierung**

Zur Evaluierung wird der Residuen Plot aus der Evaluationssoftware des Gerätes als .txt Datei exportiert. Des Weiteren werden die kinetischen Daten ( $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_D$  und  $R_{\text{max}}$  jeweils mit deren Standardfehlern und  $\chi^2$ ) auch in ein Microsoft Excel Datenblatt oder ein Origin Projekt übertragen. Die Residuen werden in ihre Beträge konvertiert, um sie, anders als in der Auswertungssoftware möglich, darzustellen. Zur Verbildlichung der Abweichungen wird die Summe der Beträge der Residuen berechnet und in einem Diagramm werden auf der x- Achse die Summe der Beträge der Residuen und auf der y- Achse die Anzahl der Läufe aufgetragen. Das gleiche Diagramm wird für alle anderen Parameter auch angefertigt und ermöglicht eine Überwachung der Parameter über die Anzahl der Läufe und der Zeit im Allgemeinen.



Weiterhin werden für alle Parameter der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung, die relative Standardabweichung und die relative Standardabweichung in Prozent berechnet. In den Kontrollkarten können auch Pufferwechsel sowie Reinigungsschritte mit eingetragen werden um mögliche Ausreißer zu erklären. Ausreißer können in einer Leistungsqualifizierung nicht ausgeklammert werden.

#### **7.1.9.5. Instandhaltung und Reinigung**

Nach 30 MCK-Messungen wird der Reinigungsschritt *Desorb* mit Hilfe der *BIA desorb* Lösung 1 und 2 durchgeführt. Nach 60 MCK-Messungen wird der stärkere Reinigungsschritt *Desorb and Sanitize* mit den Lösungen *BIA desorb* 1 und 2 und der frisch verdünnten *BIA disinfectant* Lösung mit Hypochlorit durchgeführt. Danach wird das Gerät für mindestens vier Stunden mit Wasser gespült und danach werden mit dem *System Check and Pump Calibration* Programm die Peristaltikpumpe kalibriert und die Antwort, die Injektionen und das Rauschen werden überprüft. Diese Schritte sind grundsätzlich vom Hersteller empfohlen um das Gerät in einem guten und vertrauenswürdigen Zustand zu erhalten.

Während dieser Reinigungsschritte wird der Chip mit dem immobilisierten Antikörper wie vom jeweiligen Chiphersteller empfohlen gelagert, meistens in Laufpuffer im Kühlschrank bei 8 °C.

Ein Wechsel von Herstellern oder Materialien bei Pipettenspitzen und Gefäßen aus Plastik wird nicht empfohlen, da es zu unvorhersehbaren Wechselwirkungen kommen kann.

### **7.2. Methoden und Materialien für HPAC-Experimente**

#### **7.2.1. Materialien**

Die chromatographischen Messungen wurden an einer VWR Hitachi Chromaster durchgeführt. Die Datenverarbeitung wurde mit Chromaster System Manager® Hitachi High-Tech Science Corporation Version 1.1 durchgeführt. Weitere Auswertungen und Darstellungen wurden mit Microsoft Excel 2007/2016 und Origin Pro 2016 ausgeführt. Für die Immobilisierungen wurde eine eigens umgebaute Merck Hitachi L-6200A Intelligent Pump genutzt. Die Pumpe wurde so umgebaut, dass sie nur noch einen Eingang und einen Ausgang hat, die beide freizugänglich liegen. Die Steuerung des Flusses und des Drucks sind weiterhin möglich.

Die Chromolith® Säulen, mit Epoxyendgruppen auf der Oberfläche, 5 mm Länge und 4,6 mm Durchmesser wurden von Merck bezogen. Der Puffer, der als mobile Phase und als Lösungsmittel für die Analyten diente, ist der Phosphat Puffer pH 7,4 nach Sørensen. Dafür wurden Dinatriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat von analytischer Qualität verwendet. Für die Immobilisierung wurde 2 %ige Schwefelsäure, 0,1 M Natriumperiodat in einem 4:1 Wasser:Methanol Gemisch, Phosphat Puffer nach Sørensen mit 1,9 M Ammoniumsulfat eingestellt auf pH 8 mit 5 mM Natriumcyanoborhydrid und ein 50 mM Phosphatpuffer aus Natriumdihydrogenphosphat pH 3 mit 5 mM oder 50 mM Natriumcyanoborhydrid benötigt. Alle Substanzen waren von analytischer Qualität. Das humane Serumalbumin wurde von Sigma Aldrich bezogen. Das Carbamazepin wurde in den

Konzentrationen 15-298,75  $\mu\text{M}$  mit Sørensen-Puffer angesetzt. Das D- und L-Tryptophan wurden auch mit Sørensen-Puffer angesetzt. Für alle Lösungen wurde Reinstwasser verwendet.

Die Messungen wurden bei konstanten 25 °C durchgeführt.

## **7.2.2. Immobilisierung**

### **7.2.2.1. Erstes Immobilisierungsprotokoll**

Die Säule wurde 30 Minuten von 2 %iger  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 2 mL/min durchflossen. Danach bei gleichem Fluss mit Reinstwasser gespült und anschließend wurde für 90 Minuten 0,1 M  $\text{NaIO}_4$ -Lösung durch den Monolithen gepumpt. Daraufhin wurde wieder mit Reinstwasser gespült und dann für 180 Minuten HSA mit 5 mg/mL in Phosphatpuffer nach Sørensen mit einem Fluss von 0,2 mL im Kreis gepumpt. Am Ende wurde eine 5 mM  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  Lösung in 50 mM Phosphatpuffer pH 3 mit einem Fluss von 1 mL/min für 20 Minuten durch die Säule gepumpt.

### **7.2.2.2. Zweites Immobilisierungsprotokoll**

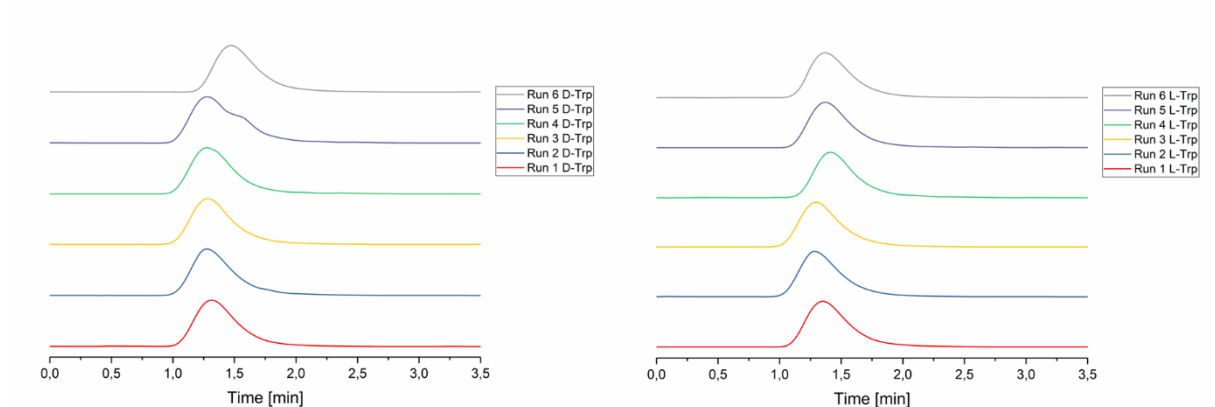
Die ersten drei Schritte verliefen identisch zum ersten Protokoll. Anschließend an das Spülen mit Reinstwasser wurde das HSA auch wieder in einer Konzentration von 5 mg/mL eingesetzt, allerdings wurde dem Phosphatpuffer nach Sørensen Ammoniumsulfat  $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$  in einer Konzentration von 1,9 mol und Natriumcyanoborhydrat  $[\text{NaBH}_3\text{CN}]$  in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt und auf pH 8 eingestellt. Im letzten Schritt wurde die Konzentration des Reduktionsmittels  $\text{NaBH}_3\text{CN}$  auf 50 mM erhöht. Die Flussraten blieben gleich denen im ersten Protokoll.

## **7.2.3. Chirale Trennung von D- und L-Tryptophan**

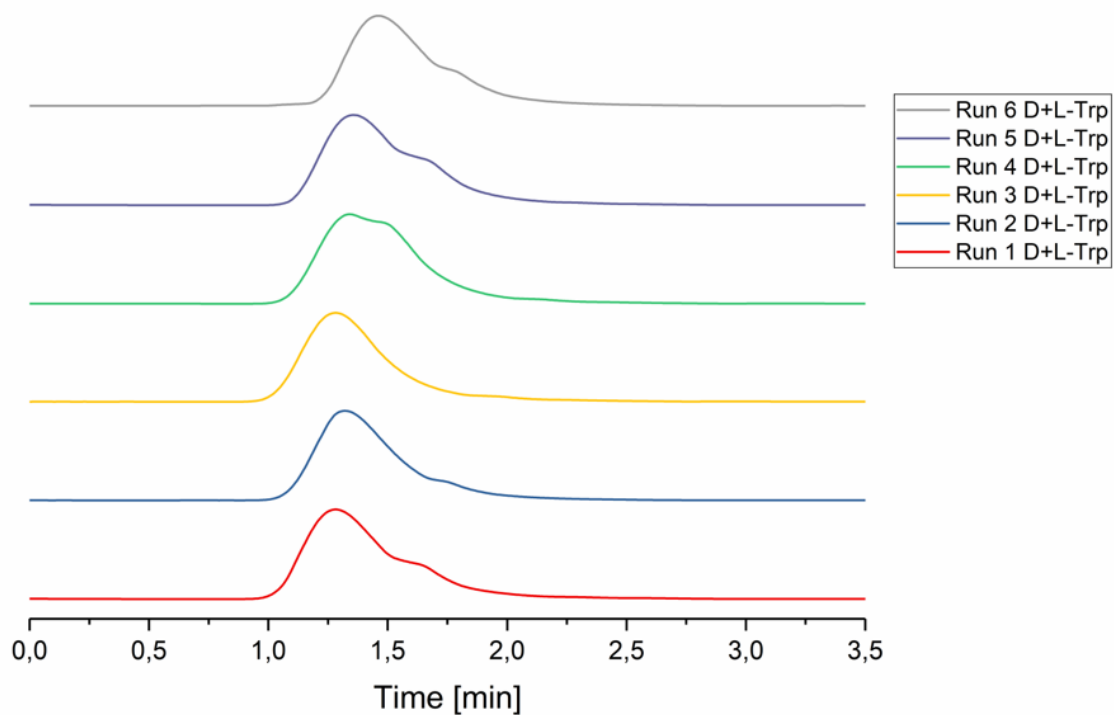
### **7.2.3.1. Erste Säule**

Mit der ersten Säule wurden jeweils sechs Läufe von den Lösungen D-Tryptophan (28,89  $\mu\text{M}$ ), L-Tryptophan (27,12  $\mu\text{M}$ ) und des Racemates aus D- und L-Tryptophan (31,4  $\mu\text{M}$ ) durchgeführt. Die Injektionsmenge betrug durchgehend 20  $\mu\text{L}$  und die Laufzeit betrug 3,5 min. Die Flussrate betrug 0,15 mL/min und es wurde das ganze UV-Spektrum aufgezeichnet,

ausgewertet wurde dann bei der Wellenlänge 280 nm. Die mobile Phase war Phosphatpuffer nach Sörensen pH 7,4.



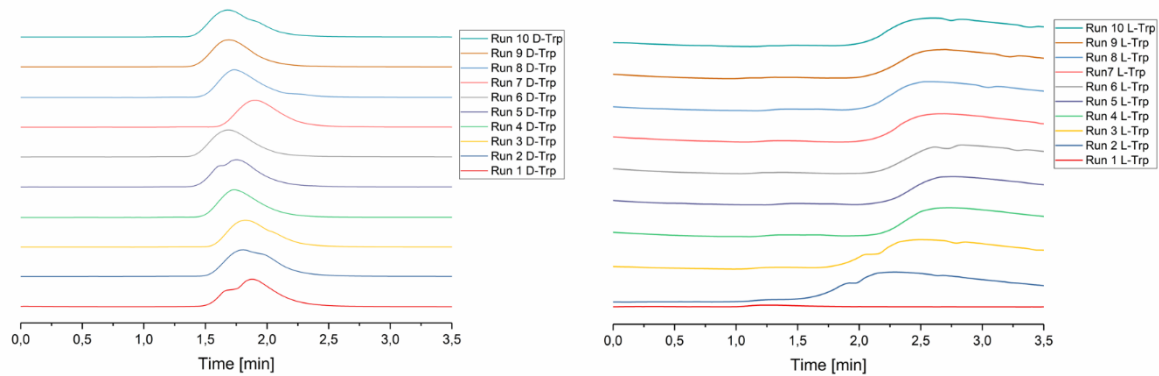
**Abbildung 51: Jeweils sechs übereinander angeordnete Chromatogramme von links D-Trp und rechts L-Trp der ersten Säule.**



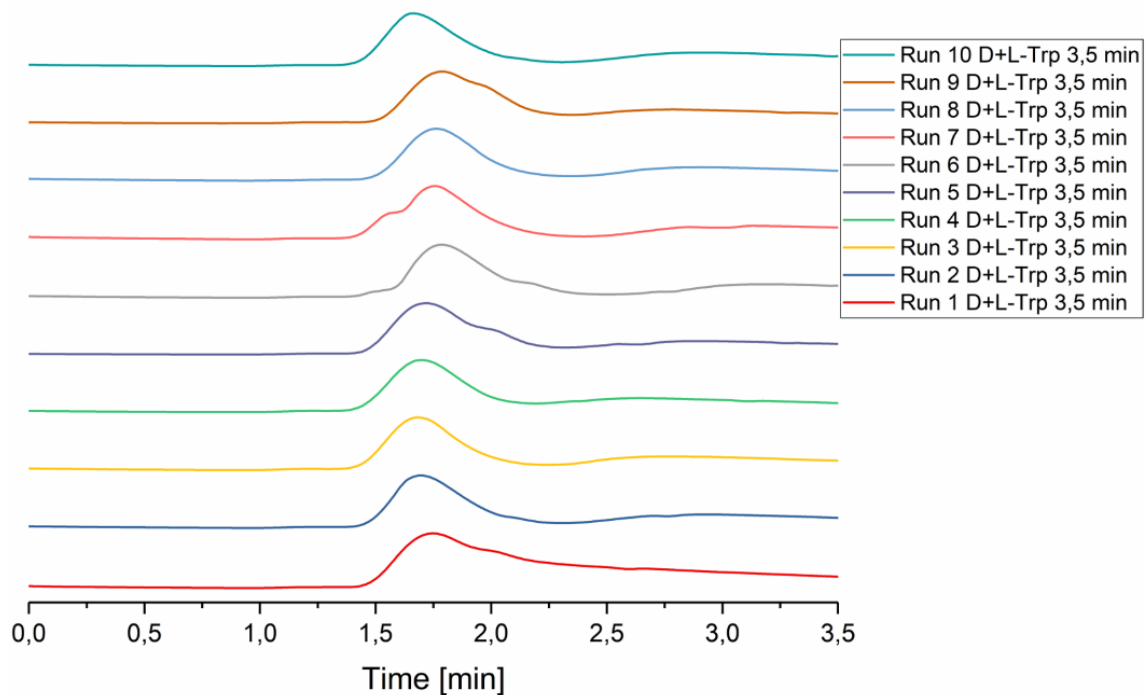
**Abbildung 52: Übereinander angeordnete Chromatogramme der sechs Läufe mit einer Mischung aus D- und L-Trp der ersten Säule.**

### 7.2.3.2. Zweite Säule

Es wurden jeweils zehn Läufe der drei Lösungen vermessen. Die Konzentrationen, Laufzeiten, Injektionsmengen und Flussraten blieben gleich.

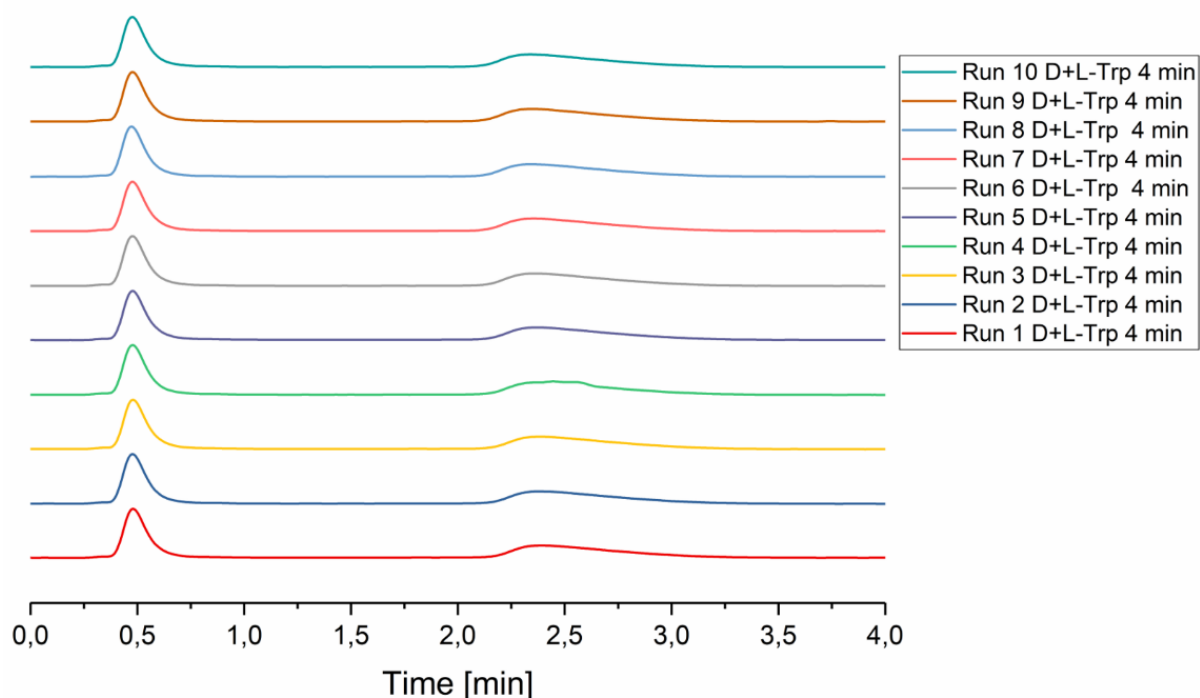


**Abbildung 53:** Jeweils zehn übereinander angeordnete Chromatogramme von links D- und rechts L-Trp der zweiten Säule mit einem Fluss von 0,15 mL.



**Abbildung 54:** Zehn übereinander angeordnete Chromatogramme der Mischung aus D- und L-Trp über die zweite Säule bei einem Fluss von 0,15 mL.

Nachdem eine Basislinientrennung noch nicht komplett erfolgreich war, wurde die Flussrate von 0,15 auf 0,5 mL/min erhöht und die Laufzeit auf 4 Minuten erweitert.



**Abbildung 55:** Zehn übereinander angeordnete Chromatogramme der Mischung aus D- und L-Trp mit einem Fluss von 0,5 mL.

#### 7.2.4. FAC Messungen mit Carbamazepin [92]

Für diese Messungen im Rahmen eines Wahlpflichtfaches wurden Referenzsäulen hergestellt, nach dem Protokoll der ersten Säule. Eine Referenzsäule wurde wie die HSA Säule behandelt nur, dass während der HSA-Zugabe reiner Puffer verwendet wurde, um unspezifische Bindungen des Analyten mit der Silica-Grundlage am Ende der Messungen abziehen zu können. Als weitere Referenzsäule wurde eine Säule mit Fibrinogen immobilisiert, um unspezifische Bindungen des Analyten mit Proteinen im Allgemeinen ausschließen zu können.

Die 13 Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen von Carbamazepin wurden mit der mobilen Phase, dem Phosphatpuffer nach Sörensen (66,7 mM) pH 7,4 hergestellt. Die Lösungen wurden 12 Minuten mit einem Fluss von 0,3 mL/min über den Einlass der mobilen Phasen appliziert. Anschließend wurde die Säule mit Phosphatpuffer ohne Analyten, bei höherem Fluss, gespült.

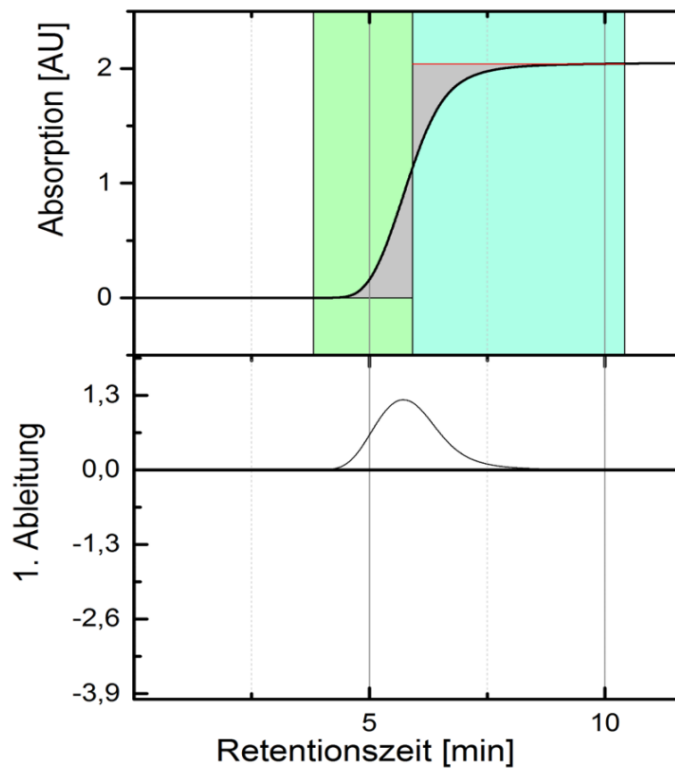


Abbildung 56: Oben ist das Chromatogramm von Carbamazepin mit der Durchbruchkurve dargestellt und darunter deren 1. Ableitung.

## 8. Literaturverzeichnis

1. United States Pharmacopoeia 40 (Hrsg) (2017) <1058> Analytical Instrument Qualification
2. United States Pharmacopoeia 40 (Hrsg) (2017) <1033> Biological Assay Validation
3. Europäisches Arzneibuch 8.0 (Hrsg) 5.1.6 Alternative Methoden zur Kontrolle der mikrobiologischen Qualität
4. Europäisches Arzneibuch 8.2 (Hrsg) 2.6.21 Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäuren
5. Europäisches Arzneibuch 8.0 (Hrsg) 2.2.40 NIR-Spektroskopie
6. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Zugriffen: 23. März 2017
7. European Commission (2015) EudraLex - Volume 4 - EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use - Annex 15: Qualification and Validation
8. Internationale Organisation für Normung DIN EN ISO/IEC 17025:2018-03. <https://www.beuth.de/de/norm/din-en-iso-iec-17025/278030106>. Zugriffen: 16. September 2018
9. Deutsche Akkreditierungsstelle ISO/IEC 17025:2017. <https://www.dakks.de/content/neue-labornorm-isoiec-170252017-%E2%80%93-dakks-bereitet-umstellung-vor-0>. Zugriffen: 16. September 2018
10. Kaminski L, Groh A, Renger B, Feuäner C (2011) Why System Suitability Tests Are Not a Substitute for Analytical Instrument Qualification (Part 3): Performance Qualification (PQ). LC GC Eur. 24(8)
11. Cianciulli C, Watzig H (2012) Analytical instrument qualification in capillary electrophoresis. Electrophoresis 33(11):1499–1508. doi:10.1002/elps.201100699
12. Kaminski L, Degenhardt M, Ermer J, Feussner C, Hower-Fritzen H, Link P, Renger B, Tegtmeier M, Watzig H (2010) Efficient and economic HPLC performance qualification. J Pharm Biomed Anal 51(3):557–564. doi:10.1016/j.jpba.2009.09.011
13. Cianciulli C (2014) Qualifizierungskonzepte und Qualitätsaspekte bei kapillarelektrophoretischen Proteinbestimmungen
14. Kaminski L (2011) Aspekte des wirtschaftlichen und effizienten Einsatzes der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
15. Krizman P, Cernelic K, Wondra A, Rodic Z, Prosek M (2013) The importance of standardization in quantitative thin-layer chromatography — retrospective and case studies. Journal of Planar Chromatography — Modern TLC 26(4):299–305. doi:10.1556/JPC.26.2013.4.1
16. Tuck MK, Chan DW, Chia D, Godwin AK, Grizzle WE, Krueger KE, Rom W, Sanda M, Sorbara L, Stass S, Wang W, Brenner DE (2009) Standard operating procedures for serum and plasma collection. Early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. J Proteome Res 8(1):113–117. doi:10.1021/pr800545q

17. Rosa M (2006) GLP SOPs for Equipment Calibration and Maintenance. Part 1. An overview. Qual. Assur. J. 10(2):107–110. doi:10.1002/qaj.369
18. Rosa M, Colligon I (2006) GLP SOPs for equipment calibration and maintenance. Part 2. An organized approach to streamlining procedural documentation. Qual. Assur. J. 10(3):203–207. doi:10.1002/qaj.378
19. Colligon I, Rosa M (2006) GLP SOPs for equipment calibration and maintenance part 3. Process mapping for SOP development. Qual. Assur. J. 10(4):279–285. doi:10.1002/qaj.391
20. Colligon I, Rosa M (2007) GLP SOPs for equipment calibration and maintenance. Part 4. Logistics of SOP writing. Qual. Assur. J. 11(1):60–63. doi:10.1002/qaj.402
21. Colligon I, Rosa M (2007) GLP SOPs for equipment calibration and maintenance. Part 5. SOP templates and SOP on SOPs. Qual. Assur. J. 11(3-4):295–301. doi:10.1002/qaj.427
22. Colligon I, Rosa M (2007) GLP SOPs for equipment calibration and maintenance. Part 6. Implementation of SOPs. Qual. Assur. J. 11(3-4):302–307. doi:10.1002/qaj.428
23. Popa-Burke I, Lupotsky B, Boyer J, Gannon W, Hughes R, Kadwill P, Lysterly D, Nichols J, Nixon E, Rimmer D, Saiz-Nicolas I, Sanfiz-Pinto B, Holland S (2009) Establishing quality assurance criteria for serial dilution operations on liquid-handling equipment. J Biomol Screen 14(8):1017–1030. doi:10.1177/1087057109339938
24. US Food and Drug Administration Title 21: Food and Drugs Part 58—Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies - Subpart E - Testing Facilities Operation - §58.81 Standard Operating Procedures
25. European Commission (2014) EudraLex - Volume 4 - EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use - Part 1 - Chapter 6: Quality Control
26. European Commission (2013) EudraLex - Volume 4 - EU Guidelines for Good Manufacturing Practice for Medicinal Products for Human and Veterinary Use - Chapter 1: Pharmaceutical Quality System
27. Benneyan JC (1998) Use and interpretation of statistical quality control charts. Int. J. Qual. Health Care 10(1):69–73. doi:10.1093/intqhc/10.1.69
28. Wernimont G (1946) Use of Control Charts in the Analytical Laboratory. Ind. Engin. Chem. 18(10):587–592
29. Mullins E (1994) Introduction to Control Charts in the Analytical Laboratory - Tutorial Review. Analyst (119):369–375. doi:10.1039/AN9941900369
30. Montgomery DC (2013) Statistical quality control. A modern introduction, 7. Aufl. Wiley, Hoboken, NJ
31. Cornish-Bowden A (2001) Detection of errors of interpretation in experiments in enzyme kinetics. Methods 24(2):181–190. doi:10.1006/meth.2001.1179
32. Findlay JWA, Khan MN (2010) Chapter 1. Ligand-Binding Assays in Drug Development: Introduction and Historical Perspective. In: Khan MN, Findlay JWA (Hrsg) Ligand-binding assays. Development, validation, and implementation in the drug development arena, Bd 40. Wiley, Hoboken N.J., S 1–13



33. Wang HF, Findlay JWA (2010) Chapter 13. Alternative and Emerging Methodologies in Ligand-Binding Assays. In: Khan MN, Findlay JWA (Hrsg) Ligand-binding assays. Development, validation, and implementation in the drug development arena. Wiley, Hoboken N.J., S 343–380
34. Khan MN, Findlay JWA (Hrsg) (2010) Ligand-binding assays. Development, validation, and implementation in the drug development arena. Wiley, Hoboken N.J.
35. Langer N, Steinicke F, Lindigkeit R, Ernst L, Beuerle T (2017) Determination of cross-reactivity of poly- and monoclonal antibodies for synthetic cannabinoids by direct SPR and ELISA. *Forensic Sci. Int.* 280:25–34. doi:10.1016/j.forsciint.2017.09.011
36. Masson J-F (2017) Surface Plasmon Resonance Clinical Biosensors for Medical Diagnostics. *ACS Sens* 2(1):16–30. doi:10.1021/acssensors.6b00763
37. Hulme EC, Trevethick MA (2010) Review: Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *British Journal of Pharmacology* (161):1219–1237
38. Wätzig H, Oltmann-Norden I, Steinicke F, Alhazmi HA, Nachbar M, El-Hady DA, Albishri HM, Baumann K, Exner T, Böckler FM, El Deeb S (2015) Data quality in drug discovery: the role of analytical performance in ligand binding assays. *J. Comput. Aid. Mol. Des.* 29(9):847–865. doi:10.1007/s10822-015-9851-6
39. Kramer C, Kalliokoski T, Gedeck P, Vulpetti A (2012) The experimental uncertainty of heterogeneous public K(i) data. *J. Med. Chem.* 55(11):5165–5173. doi:10.1021/jm300131x
40. Kastritis PL, Bonvin, A. M. J. J. (2012) On the binding affinity of macromolecular interactions: daring to ask why proteins interact. *J. R. Soc. Interface* 10(79):20120835. doi:10.1098/rsif.2012.0835
41. Steinicke F, Oltmann-Norden I, Watzig H (2017) Long term kinetic measurements revealing precision and general performance of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Biochem.* 530:94–103. doi:10.1016/j.ab.2017.05.009
42. Vuignier K, Schappler J, Veuthey J-L, Carrupt P-A, Martel S (2010) Drug-protein binding: a critical review of analytical tools. *Anal. Bioanal. Chem.* 398(1):53–66. doi:10.1007/s00216-010-3737-1
43. Mia Yang (2012) Biosensors in the Processing and Analysis of Biopharmaceuticals. In: Subramanian G (Hrsg) Biopharmaceutical Production Technology, 1. Aufl. Wiley-VCH, s.l., S 445–471
44. Wild D (2013) Immunoassay for Beginners. In: Wild DG, John R (Hrsg) The immunoassay handbook. Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques, 4. Aufl. Elsevier, Amsterdam, S 7–10
45. Khan MN, Dass PD, Leete JH, Schuman RF, Gunsior M, Sadhu C (2010) Chapter 3. Development of Ligand-Binding Assays for Drug Development Support. In: Khan MN, Findlay JWA (Hrsg) Ligand-binding assays. Development, validation, and implementation in the drug development arena. Wiley, Hoboken N.J., S 39–79
46. Fraser S, Shih JY, Ware M, O'Connor E, Cameron MJ, Schwickart M, Zhao X, Regnstrom K (2017) Current Trends in Ligand Binding Real-Time Measurement Technologies. *AAPS J* 19(3):682–691. doi:10.1208/s12248-017-0067-7

47. Myszka DG (1999) Survey of the 1998 optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* (12):390–408
48. Rich RL, Myszka DG (1999) Survey of the 1999 surface plasmon resonance biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* (13):388–407
49. Rich RL, Myszka DG (2001) Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 14(5):273–294. doi:10.1002/jmr.547
50. Rich RL, Myszka DG (2002) Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 15(6):352–376. doi:10.1002/jmr.598
51. Rich RL, Myszka DG (2003) A survey of the year 2002 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 16(6):351–382. doi:10.1002/jmr.649
52. Rich RL, Myszka DG (2005) Survey of the year 2003 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 18(1):1–39. doi:10.1002/jmr.726
53. Rich RL, Myszka DG (2005) Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 18(6):431–478. doi:10.1002/jmr.753
54. Rich RL, Myszka DG (2006) Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 19(6):478–534. doi:10.1002/jmr.808
55. Rich RL, Myszka DG (2007) Survey of the year 2006 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 20(5):300–366. doi:10.1002/jmr.862
56. Rich RL, Myszka DG (2008) Survey of the year 2007 commercial optical biosensor literature. *J. Mol. Recognit.* 21(6):355–400. doi:10.1002/jmr.928
57. Rich RL, Myszka DG (2010) Grading the commercial optical biosensor literature-Class of 2008. 'The Mighty Binders'. *J Mol Recognit* 23(1):1–64. doi:10.1002/jmr.1004
58. Rich RL, Myszka DG (2011) Survey of the 2009 commercial optical biosensor literature. *J Mol Recognit* 24(6):892–914. doi:10.1002/jmr.1138
59. Sweep FC, Fritsch HA, Gion M, Klee GG, Schmitt M (2003) Considerations on development, validation, application, and quality control of immuno(metric) biomarker assays in clinical cancer research: an EORTC-NCI working group report. *International Journal of Oncology* 23(6):1715–1726
60. Wood RW (1902) XLII. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philosophical Magazine Series 6* 4(21):396–402. doi:10.1080/14786440209462857
61. Otto A (1968) Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Z. Physik* 216(4):398–410. doi:10.1007/BF01391532
62. Kretschmann E (1971) Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Z. Physik* 241(4):313–324. doi:10.1007/BF01395428
63. Liedberg B, Nylander C, Lunström I (1983) Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 4:299–304. doi:10.1016/0250-6874(83)85036-7
64. Cooper MA (2002) Optical biosensors in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 1(7):515–528. doi:10.1038/nrd838

65. Couture M, Zhao SS, Masson J-F (2013) Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15(27):11190. doi:10.1039/c3cp50281c
66. Rich RL, Myszka DG (2004) Why you should be using more SPR biosensor technology. *Drug Discovery Today: Technologies* 1(3):301–308. doi:10.1016/j.ddtec.2004.09.009
67. GE Healthcare Lifesciences, Uzunova A (2014) Affinity Measurement with Biomolecular Interaction Analysis - Biacore
68. Tudos AJ, Schasfoort RBM (2008) Chapter 1. Introduction to Surface Plasmon Resonance. In: Schasfoort RBM, Tudos AJ (Hrsg) *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, S 1–14
69. Schasfoort RBM, McWhirter A (2008) Chapter 3. SPR Instrumentation. In: Schasfoort RBM, Tudos AJ (Hrsg) *Handbook of Surface Plasmon Resonance*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, S 35–80
70. GE Healthcare Lifesciences Sensor Chips. <https://www.gelifesciences.com/shop/protein-analysis/spr-label-free-analysis/sensor-chips>. Zugegriffen: 24. Februar 2018
71. GE Healthcare Lifesciences (2008) Sensor Surface Handbook. BR-1005-71. GE Company, Uppsala
72. GE Healthcare Lifesciences (2008) Biacore X100 Handbook, 03. Aufl. GE Company
73. UniProt UniProtKB - P61769 (B2MG\_HUMAN). Beta-2-microglobulin. <https://www.uniprot.org/uniprot/P61769>. Zugegriffen: 10. September 2018
74. Sigma Aldrich Monoclonal Anti-B2M antibody produced in mouse. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/sab4700014?lang=de&region=D> E. Zugegriffen: 10. September 2018
75. GE Healthcare Lifesciences (2009) Biacore X100 Getting Started. GE Company
76. Myszka DG (1999) Improving biosensor analysis. *J. Mol. Recognit.* (12):279–284
77. Rich RL, Papalia GA, Flynn PJ et al (2009) A global benchmark study using affinity-based biosensors. *Anal. Biochem.* 386(2):194–216. doi:10.1016/j.ab.2008.11.021
78. McDonald GR, Hudson AL, Dunn SMJ, You H, Baker GB, Whittall RM, Martin JW, Jha A, Edmondson DE, Holt A (2008) Bioactive contaminants leach from disposable laboratory plasticware. *Science* 322(5903):917. doi:10.1126/science.1162395
79. Olivieri A, Degenhardt OS, McDonald GR, Narang D, Paulsen IM, Kozuska JL, Holt A (2012) On the disruption of biochemical and biological assays by chemicals leaching from disposable laboratory plasticware. *Can J Physiol Pharmacol* 90(6):697–703. doi:10.1139/y2012-049
80. GE Healthcare Lifesciences (2008) BIAevaluation Software Handbook
81. Eppendorf AG (2016) Bedienungsanleitung - Research plus. Eppendorf Research® plus
82. Pögel Neé Steinicke F, Oltmann-Norden I, Wätzig H (2018) Performance qualification for reproducible Surface Plasmon Resonance analysis. *Anal. Biochem.* 544:108–113. doi:10.1016/j.ab.2017.12.027
83. Hage DS, Anguizola JA, Li R, Matsuda R, Papastavros E, Pfaunmiller E, Sobansky M, Zheng X Affinity Chromatography, S 1–23
84. Walters RR (1985) Affinity chromatography. *Analytical Chemistry* 57(11):1099–1114

85. Martínez-Gómez MA, Sagrado S, Villanueva-Camañas RM, Medina-Hernández MJ (2007) Enantioseparation of phenothiazines by affinity electrokinetic chromatography using human serum albumin as chiral selector: application to enantiomeric quality control in pharmaceutical formulations. *Anal Chim Acta* 582(2):223–228. doi:10.1016/j.aca.2006.09.036
86. Vuignier K, Guillarme D, Veuthey J-L, Carrupt P-A, Schappler J (2013) High performance affinity chromatography (HPAC) as a high-throughput screening tool in drug discovery to study drug-plasma protein interactions. *J Pharm Biomed Anal* 74:205–212. doi:10.1016/j.jpba.2012.10.030
87. Rakow TF (2017) Analytik von proteinogenen und niedermolekularen Arzneistoffen unter Verwendung von Hochleistungsflüssigchromatographie, Hochauflösender Kontinuumsstrahler Atomabsorptionsspektrometrie und weiteren Techniken, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
88. Merck KGaA (2016) Chromolith® Widedpore Epoxy - Research Sample. General Information
89. Kupfer, Tom (2016) Immobilization of Silica Monoliths
90. Mallik R, Jiang T, Hage DS (2004) High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns. *Analytical Chemistry* 76(23):7013–7022. doi:10.1021/ac049001q
91. Yang J, Hage DS (1993) Characterization of the binding and chiral separation of d- and l-tryptophan on a high-performance immobilized human serum albumin column. *Journal of Chromatography A* 645(2):241–250. doi:10.1016/0021-9673(93)83383-4
92. Greß M, Kröger B, Krummland P, Stein M, Steinicke F, Wätzig H (2017) High performance affinity chromatography (HPAC) von Carbamazepin an einer mit humanem Serumalbumin (HSA) immobilisierten Monolithsäule. Wahlpflichtfach WS 16/17 TU Braunschweig
93. Kim HS, Hage DS (2005) Chromatographic analysis of carbamazepine binding to human serum albumin. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 816(1-2):57–66. doi:10.1016/j.jchromb.2004.11.006
94. Yoo MJ, Schiel JE, Hage DS (2010) Evaluation of affinity microcolumns containing human serum albumin for rapid analysis of drug-protein binding. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(20):1707–1713. doi:10.1016/j.jchromb.2010.04.028
95. Xantec bioanalytics (2015) Product information: Immobilization on carboxylated and NHS activated surfaces